

(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 043 399 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
11.10.2000 Patentblatt 2000/41

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/86, C12N 7/01,
C12N 7/04, C12N 5/10,
C07K 14/18, A61K 49/00,
A61K 48/00

(21) Anmeldenummer: 00105929.4

(22) Anmeldetag: 23.03.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 03.04.1999 DE 19915178

(71) Anmelder:
Bartenschlager, Ralf, Dr.
55239 Gau-Odernheim (DE)

(72) Erfinder:
Bartenschlager, Ralf, Dr.
55239 Gau-Odernheim (DE)

(74) Vertreter: Rudolph, Ulrike, Dr.
Patentanwältin
In der Schanz 10
69198 Schriesheim (DE)

(54) Hepatitis C Virus Zellkultursystem

(57) Das erfindungsgemäße Hepatitis C Virus (HCV) Zellkultursystem besteht aus humanen Hepatoma-Zellen, die mit einem HCV-RNA-Konstrukt transfiziert sind, das die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zudem wenigstens ein selektierbares Marker-Gen (Selektionsgen) umfaßt.

EP 1 043 399 A2

Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft ein Hepatitis C Virus (HCV) Zellkultursystem, das im wesentlichen eukaryontische Zellen umfaßt, die eingeschleustes HCV-spezifisches Genmaterial enthalten, d.h. die mit HCV-spezifischem Genmaterial transzisiert sind.
- [0002] Das Hepatitis C Virus (HCV) ist eine der Hauptursachen chronischer und sporadischer Leberkrankungen weltweit. Die meisten HCV-Infektionen verlaufen ohne erkennbare klinische Symptome, allerdings werden 80-90% der Infizierten dauerhafte Virusträger und bei 50% dieser dauerhaften Virusträger kommt es zu einer chronischen Leberentzündung mit unterschiedlichen Schweregraden. Ca. 20% der chronisch Infizierten entwickeln im Laufe von 10 bis 20 Jahren eine Leberzirrhose, auf deren Basis sich ein primäres Leberzellkarzinom entwickeln kann. Die chronische Hepatitis C ist heute die Hauptindikation für eine Lebertransplantation. Eine Kausaltherapie gibt es bisher noch nicht. Die einzige derzeit verfügbare Therapie ist die hochdosierte Verabreichung von Interferon-Alpha oder eine Kombination aus Interferon-Alpha und dem Purin-Nukleosidanalogon Ribavirin. Allerdings sprechen nur ca. 60 % aller Behandelten auf diese Therapie an und bei diesen kommt es in mehr als der Hälfte aller Fälle nach dem Absetzen der Behandlung zu einer erneuten Virämie.
- Aufgrund der hohen Prävalenz, gerade auch in den Industrieländern, den schwerwiegenden Folgen chronischer Infektionen und dem Fehlen einer Kausaltherapie ist die Entwicklung einer HCV-spezifischen Chemotherapie ein wesentliches Ziel der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Hauptproblem hierbei ist bisher das Fehlen eines geeigneten Zellkultursystems, das ein Studium der Virus-Replikation und der Pathogenese in eukaryontischen Zellen ermöglicht.
- [0003] Aufgrund der geringen Virusmengen im Blut bzw. Gewebe, dem Fehlen geeigneter Zellkultursysteme oder Tiermodelle (bis heute ist der Schimpanse das einzige mögliche Versuchstier) sowie dem Fehlen effizienter Systeme zur Produktion virus-ähnlicher Partikel, konnte die molekulare Zusammensetzung des HCV-Partikels bis heute noch nicht eingehend untersucht bzw. aufgeklärt werden. Die derzeit vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Das HCV ist ein umhülltes Plusstrang RNA Virus mit einem Partikeldurchmesser von 50-60 nm und einer mittleren Dichte von 1,03-1,1g/ml. Es wurde erstmals 1989 molekular kloniert und charakterisiert (Choo et al., 1989: *Science*, 244, 359-362). Die HCV-RNA hat eine Länge von ca. 9.6 kb (= 9600 Nukleotide), eine positive Polarität und besitzt ein einziges offenes Leseraster (ORF = open reading frame), das ein lineares Polyprotein von ca 3010 Aminosäuren kodiert (siehe Rice 1996, in *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1996), vol. 1, pp.931-960; Clarke 1997, *J. Gen. Virol.* 78, 2397; und Bartenschlager 1997, *Intervirology* 40, 378 und vgl. Fig. 1 A). Bei der Virusreplikation wird das Polyprotein durch zelluläre und virale Proteasen in die reifen und funktionell aktiven Proteine gespalten.
- Innerhalb des Polyproteins sind die Proteine wie folgt angeordnet (vom Amino- zum Carboxyterminus): Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Das Core-Protein ist die Hauptkomponente des Nukleokapsids. Die Glykoproteine E1 und E2 sind Transmembranproteine und Hauptkomponenten der Virushülle. Sie spielen wahrscheinlich bei der Anheftung des Virus an die Wirtszelle eine wesentliche Rolle. Diese drei Proteine Core, E1 und E2 bauen den Viruspartikel auf und werden deshalb als Strukturproteine bezeichnet. Die Funktion des Proteins p7 ist noch unklar. Das Protein NS2 ist wahrscheinlich die katalytische Domäne der NS2-3 Protease, die für die Prozesierung zwischen den Proteinen NS2 und NS3 verantwortlich ist. Das Protein NS3 hat zwei Funktionen, nämlich in der aminoterminalen Domäne eine Proteaseaktivität, die für die Polyproteinprozessierung essentiell ist, und in der carboxyterminalen Domäne eine NTPase/Helikase-Funktion, die wahrscheinlich bei der Replikation der viralen RNA eine Rolle spielt. Das Protein NS4A ist ein Kofaktor der NS3-Protease. Die Funktion des Proteins NS4B ist unbekannt.
- [0004] Das offene Leseraster ist an seinem 5' Ende von einer ca 340 Nukleotide langen nicht-translatierten Region (NTR = non-translated region) flankiert, die als interne Ribosomenansatzstelle (IRES = internal ribosome entry site) fungiert, und an seinem 3' Ende von einer ca. 230 Nukleotide langen NTR, die höchstwahrscheinlich für die Genomreplikation von Bedeutung ist. Eine solche 3' NTR ist Gegenstand der Patentanmeldung PCT/US 96/14033. Die Strukturproteine in dem amino-terminalen Viertel des Polyproteins werden von der Signalpeptidase der Wirtszelle gespalten. Die Nicht-Strukturproteine (NS) 2 bis (NS) 5B werden von zwei viralen Enzymen prozessiert, nämlich von der NS2-3 und der NS3/4A Proteinase. Die NS3/4A Proteinase wird für alle Spaltungen jenseits des Carboxyterminus von NS3 benötigt. Die Rolle von NS4B ist nicht bekannt. NS5A, ein hoch phosphoryliertes Protein, scheint für die Interferon Resistenz verschiedener HCV-Genotypen verantwortlich zu sein (vgl. Enomoto et al. 1995, *J. Clin. Invest.* 96, 224; Enomoto et al. 1996, *N. Engl. J. Med.* 334, 77; Gale Jr. et al. 1997, *Virology* 230, 217; Kaneko et al. 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 320; Reed et al., 1997, *J. Virol.* 71, 7187) und NS5B wurde als die RNA-abhängige RNA Polymerase identifiziert.
- [0005] Anhand dieser Erkenntnisse wurden erste Diagnosesysteme entwickelt, die entweder auf dem Nachweis von HCV-spezifischen Antikörpern in Patientenserum oder auf dem Nachweis von HCV-spezifischer RNA mittels RT-PCR (= Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) beruhen, und die mittlerweile routine- und/oder vorschriftsmäßig bei allen Blutkonserven angewendet werden (müssen).

- [0006] Seit der Erstbeschreibung des Genoms 1989 wurden mit Hilfe der PCR-Methode zahlreiche Teil- und Komplettsequenzen des HCV kloniert und charakterisiert. Ein Vergleich dieser Sequenzen zeigt eine hohe Variabilität des viralen Genoms, insbesondere im Bereich des NS5B-Gens, was letztendlich zu einer Einteilung in 6 Genotypen geführt hat, die selbst nochmals in Subtypen a, b, und c untergliedert sind. Die genomische Varianz ist nicht gleichmäßig über das Genom verteilt. So sind die 5'NTR und Teile der 3'NTR hoch konserviert, während bestimmte kodierende Sequenzen z.T. sehr stark variiieren, vor allem die Hüllproteine E1 und E2.
- [0007] Die klonierten und charakterisierten Teil- und Komplettsequenzen des HCV-Genoms wurden außerdem hinsichtlich geeigneter Angriffsziele für ein prospektives antivirales Therapeutikum untersucht. Dabei wurden drei virale Enzyme gefunden, die sich als solches Angriffsziel anbieten. Diese sind (1) der NS3/4A Proteasekomplex, (2) die NS3 10 Helikase und (3) die NS5B RNA-abhängige RNA Polymerase. Der NS3/4A Proteasekomplex und die NS3 Helikase konnten bereits kristallisiert und hinsichtlich ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärt werden (Kim et al., 1996, *Cell*, 87, 343; Yern et al., 1998, *Protein Science*, 7, 837; Love et al., 1996, *Cell*, 87, 311; Kim et al., 1998, *Structure*, 6, 89; Yao et al., 1997, *Nature Structural Biology*, 4, 463; Cho et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 15045); bei der NS5B RNA-abhängigen RNA Polymerase ist dies bis heute noch nicht gelungen.
- [0008] Obwohl mit diesen Enzymen bedeutsame Angriffsziele für eine Therapieentwicklung der chronischen HCV-Infektion definiert sind, und obwohl sowohl mit Hilfe von 'rational drug design' als auch mit Hilfe von 'high throughput screens' weltweit intensiv nach geeigneten Inhibitoren gesucht wird, leidet die Therapieentwicklung an einem großen Defizit, nämlich dem Fehlen von Zellkultursystemen oder einfachen Tiermodellen, die es erlauben, HCV-RNA oder HCV-Antigene direkt, zuverlässig und mit einfachen laborüblichen Methoden nachzuweisen. Das Fehlen solcher Zellkultursysteme ist auch der Hauptgrund dafür, daß das Verständnis der HCV-Replikation bis heute noch sehr lückenhaft und in weiten Teilen nur hypothetisch ist.
- [0009] Obwohl nach Meinung der Fachwelt eine enge evolutionäre Beziehung zwischen HCV und den Flavi- und Pestiviren besteht und für diese autonom replizierende RNAs beschrieben sind, die in verschiedenen Zelllinien ohne weiteres zur Replikation gebracht werden können und dabei relativ hohe Ausbeuten zeigen (siehe Khrömykh et al., 1997, *J. Virol.* 71, 1497; Behrens et al., 1998, *J. Virol.* 72, 2364; Moser et al., 1998, *J. Virol.* 72, 5318), waren ähnliche Versuche mit HCV bisher nicht erfolgreich.
- [0010] Zwar ist aus verschiedenen Publikationen bekannt, daß Zelllinien oder primäre Zellkulturen mit HCV-haltigem, hochtitrigem Patientenserum infiziert werden können, (Lanford et al. 1994, *Virology* 202, 606; Shimizu et al. 1993, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 90, 6037-6041; Mizutani et al. 1996, *Journal of Virology*, 70, 7219-7223; M. Ikeda et al. 1998, *Virus Res.* 56, 157; Fournier et al. 1998, *J. Gen. Virol.* 79, 2376 und darin zitierte Literaturstellen, Ito et al. 1996, *Journal of General Virology*, 77, 1043-1054), diese virusinfizierten Zelllinien oder Zellkulturen erlauben jedoch nicht den direkten Nachweis von HCV-RNA oder HCV-Antigenen. Die virale RNA in diesen Zellen ist weder in einem Nothern-Blot (einem Standardverfahren zum quantitativen Nachweis von RNA) noch sind die viralen Protein in einem Western-Blot oder mittels Immunpräzipitation detektierbar. Nur mit sehr aufwendigen und indirekten Methoden ist es überhaupt gelungen, eine HCV-Replikation nachzuweisen. Diese nachteiligen Umstände zeigen klar, daß die Replikation in diesen bekannten virusinfizierten Zelllinien oder Zellkulturen absolut unzureichend ist.
- [0011] Des Weiteren ist aus den Publikationen von Yoo et al. (1995, *Journal of Virology*, 69, 32-38) und von Dash et al., (1997, *American Journal of Pathology*, 151, 363-373) bekannt, daß Hepatomazelllinien mit synthetischer HCV-RNA, die mittels *in vitro* Transkription von kloniertem HCV-Genom gewonnen wurde, transfiziert werden können. In beiden Publikationen gingen die Autoren von dem Grundgedanken aus, daß das virale HCV-Genom eine Plusstrang-RNA ist, die nach dem Einschleusen in die Zelle direkt als mRNA fungiert, an die sich Ribosomen anheften und im Zuge von Translationsprozessen Virusproteine bilden, aus denen sich letztendlich neue HCV-Partikel bilden (können). Diese Virusreplikation, d.h. diese neu gebildeten HCV-Viren bzw. deren RNA wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Die publizierten Ergebnisse der durchgeföhrten RT-PCR sprechen jedoch dafür, daß die Effizienz der HCV-Replikation in den beschriebenen HCV-transfizierten Hepatomazellen nur sehr gering ist und jedenfalls nicht ausreicht, um Schwankungen in der Replikationsrate nach gezielter Einwirkung mit prospektiven antiviralen Therapeutika auch nur qualitativ, geschweige denn quantitativ zu messen. Außerdem ist im Stand der Technik mittlerweile bekannt (Yanagi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 2291-95, 1999), daß die hochkonservierte 3' NTR essentiell ist für die Virusreplikation, was in klarem Widerspruch zu den Behauptungen von Yoo et al. und Dash et al. steht, die für ihre Versuche in Unkenntnis des authentischen 3' Endes des HCV-Genoms ausschließlich HCV-Genome mit verkürzten 3' NTRs verwendet haben.
- [0012] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines HCV- Zellkultursystems, bei dem die virale RNA in den transfizierten Zellen autonom und mit so hoher Effizienz repliziert, daß Schwankungen in der Replikationsrate nach gezielter Einwirkung mit virus- und insbesondere HCV-spezifischen prospektiven antiviralen Therapeutika qualitativ und quantitativ und mit Hilfe gängiger, laborüblicher Meßverfahren gemessen werden können.
- [0013] Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Zellkultursystems der eingangs genannten Art, bei dem die eukaryontischen Zellen humane Zellen, insbesondere Hepatomazellen sind, die vorzugsweise von einer handelsüblichen Hepatomazelllinie abstammen, aber auch aus einer entsprechenden Primärzellkultur gewonnen sein können, und bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt ist, das im

wesentlichen die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR, vorzugsweise in der genannten Reihenfolge, und zudem wenigstens ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt. "NTR" steht hier und im folgenden für "nicht-translatierte Region" und ist dem einschlägigen Fachmann als Begriff bzw. Abkürzung bekannt und geläufig. Der Begriff "HCV-RNA-Konstrukt" umfaßt hier und im folgenden sowohl Konstrukte, die das komplette HCV-Genom enthalten, als auch solche, die lediglich einen Teil davon, d.h. ein HCV-Subgenom enthalten.

Eine bevorzugte Variante des erfindungsgemäßen Zellkultursystems, die sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, ist unter der Nummer DSM ACC2394 (Laborbezeichnung HuBl 9-13) bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, Deutschland, hinterlegt.

[0013] Mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem wird erstmals ein in-vitro-System bereit gestellt, in dem HCV-RNA intrazellulär, autonom und in ausreichend großen Mengen repliziert und exprimiert wird, so daß eine quantitative Bestimmung sowohl der HCV-RNA-Mengen als auch der HCV-spezifischen Proteine mit konventionellen und zuverlässig genauen biochemischen Meßmethoden durchgeführt werden kann. Das heißt: es steht erstmals ein annähernd authentisches zellgestütztes ("cell-based") HCV-Replikationssystem zur Verfügung, das für die Entwicklung und Erprobung von antiviralen Pharmazeutika dringend benötigt wird. Dieses Testsystem bietet nun die Möglichkeit, potentielle Angriffsziele für eine wirksame HCV-spezifische Therapie zu identifizieren und HCV-spezifische Chemotherapeutika zu entwickeln und zu evaluieren.

[0014] Die Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, daß eine effiziente Replikation der HCV-RNA nur dann in Zellen stattfindet, wenn diese mit einem HCV-RNA-Konstrukt transfiziert wurden, das mindestens die 5' und die 3' nicht-translatierten Regionen (NTR) und die Nichtstrukturproteine (NS) 3 bis 5B umfaßt und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) aufweist. Offensichtlich sind die Strukturgene für den Ablauf der Replikation ohne wesentliche Bedeutung, während andererseits eine effiziente Replikation der HCV-RNA anscheinend nur dann stattfindet, wenn die transfizierten Zellen einem permanenten Selektionsdruck unterzogen werden, der durch das mit der HCV-RNA verbundene selektierbare Markergen (Selektionsgen) vermittelt wird. Das Markergen (Selektionsgen) scheint somit einerseits die Selektion derjenigen Zellen zu provozieren, in denen die HCV-RNA produktiv repliziert, und andererseits scheint es die Effizienz der RNA-Replikation wesentlich zu steigern.

[0015] Gegenstand der Erfindung ist auch ein zellfreies HCV-RNA-Konstrukt, das sich dadurch auszeichnet, daß es die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR, vorzugsweise in der genannten Reihenfolge, und zudem ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt.

[0016] Der Begriff 5' NTR bzw. NS3 bzw. NS4A bzw. NS4B bzw. NS5A bzw. NS5B bzw. 3' NTR umfaßt im vorliegenden Zusammenhang jede Nukleotidsequenz, die im Stand der Technik als Nukleotidsequenz für den jeweils betreffenden funktionellen Abschnitt des HCV-Genoms beschrieben ist.

[0017] Die Bereitstellung eines solchen HCV-RNA-Konstrukt eröffnet erstmals eine detaillierte Analyse der HCV - Replikation, - Pathogenese und - Evolution in Zellkulturen. Die HCV-spezifische virale RNA kann - als vollständiges Genom oder als Subgenom - gezielt in beliebigen Mengen erzeugt werden, und es besteht die Möglichkeit, das RNA-Konstrukt zu manipulieren und damit die HCV-Funktionen auf genetischer Ebene zu untersuchen und aufzuklären.

[0018] Da alle zur Zeit als Hauptangriffsziel für eine Therapie untersuchten HCV-Enzyme, nämlich die NS3/4A Protease, die NS3 Helikase und die NS5B Polymerase, in dem erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukt enthalten sind, kann es für alle entsprechenden Untersuchungen benutzt werden.

[0019] Eine Ausführungsform des HCV-RNA-Konstrukt, die sich in der praktischen Anwendung sehr gut bewährt hat, zeichnet sich dadurch aus, daß sie die Nukleotidsequenz gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO:1 umfaßt. Weitere Ausführungsvarianten mit vergleichbar guten Eigenschaften für den Einsatz in der Praxis sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleotidsequenz entweder gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:6 oder SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:9 oder SEQ ID NO:10 oder SEQ ID NO:11 umfassen.

[0020] Es besteht die Möglichkeit, das erfindungsgemäße HCV-Subgenom-Konstrukt mit einer 3' NTR zu versehen, die eine im Stand der Technik hierfür bisher unbekannte Nukleotidsequenz aufweist, nämlich eine Nukleotidsequenz, die aus der Gruppe der nachfolgend aufgelisteten Nukleotidsequenzen (a) bis (i) ausgewählt ist:

- (a) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTTA
5 GCTTTTTTTTTCTTTTTTGAGAGAGAGTCTCACTCTGTGCC
AGACTGGAGT
- (b) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
10 TTTTAGTCT TTTTTTTTC TTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCCAGACT GGAGC
- (c) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
15 TTTAATCTT TTTTTTTCT TTTTTTTGA GAGAGAGAGT CTCACTCTGT
TGCCCAGACT GCAGC
- (d) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
20 TTTTTAGTC TTTTTTTTT TCTTTTTTGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (e) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
25 TTTTAGTCT TTTTTTTTT TCTTTTTTGAGAGAGAG AGTCTCACTC
TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (f) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
30 TTTTAGTCT TTTTTTTTT TCTTTTTTGAGAGAGAG AGTCTCACTC
CTGTTGCCCA GACTGGAGT
- (g) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
35 TTTTAGTCT TTTTTTTTT CTTTTTTTGAGAGAGAGA
GTCTCACTCTGTTGCCAGA CTGGAGT
- (h) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
40 TTTTTTAAT CTTTTTTTT TTTTCCTTT TTTGAGAGA
GAGAGTCTCA CTCTGTGCC CAGACTGGAG T
- (i) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTT
45 TTTTTAATC TTTTTTTTT TTTCTTTT TTTTGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTGC CCAGACTGGA GT

Das in den erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukten enthaltene selektierbare Markergen (Selektionsgen) ist vorzugsweise ein Resistenzgen, insbesondere eine Antibiotikumresistenzgen.

Das hat den Vorteil, daß die mit diesem Konstrukt transfizierten Zellen leicht von den nicht transfizierten Zellen selektiert werden können, indem dem Zellkulturmedium z.B. im Fall eines Antibiotikumresistenzgens das betreffende Antibiotikum zugegeben wird. Unter 'Antibiotikum' wird im vorliegenden Zusammenhang jede Substanz verstanden, die die nicht-transfizierten Wirtszellen oder die Zellen, in denen die HCV-RNA nur mit geringer Effizienz repliziert, am Leben oder Wachstum hindert, insbesondere Zellgifte wie z.B. Puromycin, Hygromycin, Zeocin, Bleomycin oder Blasticidin.

[0021] Ein bevorzugtes selektierbares Markergen (Selektionsgen) bzw. Resistenzgen, das sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, ist das Neomycinphosphotransferasegen.

[0022] Eine Alternative zu den Antibiotikumresistenzgenen ist z.B. das Thymidin-Kinase-Gen, mit dem eine HAT-

Selektion durchgeführt werden kann.

[0023] Die Position des selektierbaren Markergens (Selektionsgens), bzw. des bevorzugten Resistenzgens bzw. des besonders bevorzugten Antibiotikumresistenzgens in dem HCV-RNA-Konstrukt liegt vorzugsweise hinter der HCV 5' NTR, d.h. strangabwärts der 5' NTR bzw. strangauwärts des HCV-Leserasters. Denkbar ist aber auch eine Insertion im Bereich der 3' NTR oder an anderer Stelle des HCV-Genoms oder -Subgenoms, z.B. innerhalb des Polyproteins.

[0024] Bei einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts ist das selektierbare Markergen (Selektionsgen), insbesondere ein Antibiotikumresistenzgen, über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA bzw. der HCV-Genom- oder -Subgenomsequenz verbunden.

[0025] Damit geht der Vorteil einher, daß nach erfolgter Selektion derjenigen Zellen, in denen die HCV-RNA produktiv repliziert, in den daraus gewonnenen Zellklonen das Resistenzgen durch ribozymvermittelte Spaltung von der HCV-Subgenomsequenz abgetrennt werden kann, nämlich durch Aktivierung des einklonierten Ribozyms oder, im Fall eines Konstrukt mit einer Erkennungsstelle für ein Ribozym, durch Einschleusen des Ribozyms in die Zellen (z.B. mittels Transfektion eines Ribozymkonstrukt oder Infektion mit einem viralen Expressionsvektor, in den das entsprechende Ribozym eingesetzt wurde). Auf diese Weise wird ein authentisches HCV-Genom-Konstrukt ohne Resistenzgen erhalten, das zur Bildung authentischer infektiöser Viruspartikel befähigt ist.

[0026] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts zeichnet sich dadurch aus, daß das Konstrukt wenigstens ein integriertes Reportergen aufweist.

[0027] Unter Reportergen wird im folgenden jedes Gen verstanden, dessen Anwesenheit sich nach Überführung in einen Zielorganismus leicht und im allgemeinen mit einfachen biochemischen oder auch histochemischen Methoden nachweisen läßt, d.h. das für ein Protein kodiert, welches auch in geringen Mengen einfach und zuverlässig mit den laborüblichen Meßmethoden nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

[0028] Diese Variante des HCV-RNA-Konstrukt hat den Vorteil, daß der Umfang der Replikation dieses Konstrukt anhand des Reportergenprodukts einfach und schnell mit laborüblichen Methoden gemessen werden kann.

[0029] Das Reportergen ist vorzugsweise ein Gen aus der Gruppe der Luciferasegene, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasegen), dem GFP-Gen (green-fluorescence-protein-Gen), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) oder dem SEAP-Gen (Sezernierte-Alkalische-Phosphatase-Gen). Diese Reportergene bzw. deren Produkte, nämlich die entsprechenden Reporterproteine, können z.B. mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, colorimetrisch oder mit Hilfe immunologischer Methoden (z.B. ELISA) bestimmt werden.

[0030] Als Reportergen kommt aber auch ein Surrogatmarkergen in Betracht. Darunter sind in diesem Zusammenhang solche Gene zu verstehen, die für zelluläre Proteine, Nukleinsäuren oder — allgemein — für solche Funktionen kodieren, die einer von der Virusreplikation abhängigen Variation unterliegen, und die infolgedessen in denjenigen Zellen, in denen sich das HCV bzw. das HCV-RNA-Konstrukt vermehrt, entweder reprimiert oder aktiviert werden. Das heißt: die Reduktion bzw. Aktivierung dieser Funktion ist ein Ersatzmarker für die Virusreplikation bzw. die Replikation des HCV-RNA-Konstrukt.

[0031] Die Positionen von Reportergen und selektierbarem Markergen (Selektionsgen) können so gewählt sein, daß ein aus den beiden Genprodukten gebildetes Fusionsprotein exprimiert wird. Hierbei besteht die vorteilhafte Möglichkeit, daß diese beiden Gene so in dem HCV-RNA-Konstrukt angeordnet sind, daß ihre beiden exprimierten Proteine zunächst über eine Schnittstelle für eine Protease (z.B. Ubiquitin) oder über ein selbstspaltendes Peptid (z.B. das 2A-Protein der Picornaviren) fusioniert sind und erst später proteolytisch wieder getrennt werden.

[0032] Ebensogut können diese beiden Positionen aber auch derart getrennt voneinander liegen, daß beide Genprodukte separat exprimiert werden. (z.B. in der Reihenfolge: Marker- bzw. Resistenzgen — interne Ribosomenbindungsstelle — Reportergen).

Im Fall des Reportergens hat sich eine Ausführungsvariante besonders bewährt, bei der das Reportergen in das offene Leseraster des HCV-Genoms oder -Subgenoms einkloniert ist, und zwar derart, daß es erst nach einer proteolytischen Prozessierung in eine aktive Form überführt wird.

[0033] Das erfindungsgemäße Zellkultursystem in allen seinen Variationen kann für vielfältige Zwecke eingesetzt werden. Diese umfassen:

- Das Auffinden antiviral wirksamer Substanzen. Dies können beispielsweise sein: organische Verbindungen, die unmittelbar oder mittelbar in die Virusvermehrung eingreifen (z.B. Inhibitoren der viralen Proteasen, der NS3-Helikase, der NS5B RNA-abhängigen RNA Polymerase), antisense Oligonukleotide, die an eine beliebige Zielsequenz innerhalb des HCV-RNA-Konstrukt (z.B. die 5' NTR) hybridisieren und unmittelbar oder mittelbar zu einer Beeinflussung der Virusvermehrung führen z.B. auf Grund einer Reduktion der Translation des HCV-Polyproteins oder Ribozyme, die eine beliebige HCV-RNA-Sequenz spalten und damit die Virusreplikation beeinträchtigen.
- Die Evaluierung jeglicher Art antiviral wirksamer Substanzen in Zellkultur. Solche Substanzen können beispielsweise mittels 'rational drug design' oder 'high-throughput screening' am isolierten gereinigten Enzym gefunden werden. Unter Evaluierung sind vor allem die Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften der entsprechenden Substanz sowie deren Wirkungsmechanismus zu verstehen.

EP 1 043 399 A2

- Die Identifikation neuer Angriffsziele, viralen oder zellulären Ursprungs, für eine HCV-spezifische antivirale Therapie. Ist beispielsweise ein zelluläres Protein essentiell für die Virusreplikation, kann mittels Hemmung dieses zellulären Proteins die Virusreplikation ebenfalls beeinflußt werden. Das Auffinden solcher auxiliären Faktoren ist mit dem erfindungsgemäßen System ebenfalls möglich.
 - 5 • Der Einsatz für die Resistenzbestimmung. Es ist anzunehmen, daß auf Grund der hohen Mutationsrate des HCV-Genoms Therapieresistenzen auftreten. Solche Resistenzen, die gerade bei der klinischen Zulassung einer Substanz von großer Bedeutung sind, lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem ermitteln. Zelllinien in denen sich das HCV-RNA-Konstrukt bzw. das HCV-Genom oder - Subgenom repliziert, werden mit steigenden Konzentrationen der entsprechenden Substanz inkubiert und die Replikation der viralen RNA wird entweder 10 anhand eines eingebrachten Reporters oder durch qualitative oder quantitative Bestimmung der viralen Nuklein-säuren oder Proteine bestimmt. Resistenz ist dann gegeben, wenn bei normaler Wirkstoffkonzentration keine Hemmung der Replikation zu beobachten ist. Durch Reklonierung der HCV-RNA (z.B. mittels RT-PCR) und Sequenzanalyse können die für Therapieresistenz verantwortlichen Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche ermittelt werden. Durch Einklonieren der/des entsprechenden Austausche/s in das Ursprungskonstrukt kann deren 15 Kausalität für die Therapieresistenz bewiesen werden.
 - Die Produktion von authentischen Virusproteinen (Antigene) für die Entwicklung und/oder Evaluierung von Diagnostika. Das erfindungsgemäße Zellkultursystem erlaubt auch die Expression von HCV-Antigenen in Zellkulturen. Diese Antigene können prinzipiell auch für den Aufbau diagnostischer Nachweisverfahren eingesetzt werden.
 - 20 • Die Produktion von HCV Viren und virus-ähnlichen Partikeln insbesondere zur Entwicklung oder Herstellung von Therapeutika und Impfstoffen sowie für diagnostische Zwecke. Insbesondere zellkultur-adaptierte vollständige HCV-Genome, die mit dem erfindungsgemäßen Zellkultursystem hergestellt werden können, sind in der Lage, mit hoher Effizienz in Zellkulturen zu replizieren. Diese Genome besitzen alle Funktionen des HCV und sind deshalb 25 in der Lage infektiöse Viren zu produzieren.
- 25 [0033] Das erfindungsgemäße HCV-RNA-Konstrukt für sich genommen kann in allen seinen Variationen ebenfalls für vielfältige Zwecke eingesetzt werden. Dazu gehören vor allem:
- Die Konstruktion attenuierter Hepatitis C Viren bzw. HCV-ähnlicher Partikel und deren Produktion in Zellkulturen: Durch zufällige oder gezielt hervorgerufene Mutationen, beispielsweise Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen, können attenuierte HCV- oder HCV-ähnliche Partikel erzeugt werden, d.h. Viren bzw. virusähnliche Partikel mit voller Replikatoriskompetenz aber verringriger bzw. fehlender Pathogenität. Solche attenuierte HCV- oder HCV-ähnliche Partikel sind insbesondere als Impfstoff einsetzbar.
 - 30 • Die Konstruktion von HCV-RNA-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen, beispielsweise zur Verwendung als leberzellspezifische Genfären in der Gentherapie. Auf Grund des ausgeprägten Leberzelltropismus des HCV und der Möglichkeit, Teile des Genoms durch heterologe Sequenzen zu ersetzen, lassen sich HCV-RNA-Konstrukte herstellen, bei denen beispielsweise die Strukturproteine durch ein therapeutisch wirksames Gen ersetzt werden. Das so erhaltene HCV-RNA-Konstrukt wird in Zellen eingeschleust, vorzugsweise mittels Transfektion, die die fehlenden HCV-Funktionen, beispielsweise die Strukturproteine, konstitutiv oder induzierbar exprimieren. Durch diese 35 dem Fachmann unter dem Begriff der 'Transkomplementation' bekannte Technik lassen sich Viruspartikel erzeugen, in die das HCV-RNA-Konstrukt eingebaut wird. Die so erhaltenen Partikel können für die Infektion vorzugsweise von Leberzellen verwendet werden. In diesen wird das therapeutisch wirksame Fremdgen zur Expression gebracht und entfaltet damit seine therapeutische Wirkung.
 - Das Auffinden permissiver Zellen, d.h. Zellen, in denen eine produktive Virusvermehrung erfolgt. Zu diesem Zweck wird entweder eines der vorgenannten HCV-RNA-Genomkonstrukte verwendet, das zur Bildung kompletter infektiöser Viren befähigt ist, oder es wird eines der vorgenannten HCV-Subgenom-Konstrukte eingesetzt, das allerdings zunächst gemäß vorgenanntem Beispiel in eine Zelllinie transfiziert wird, die die fehlenden Funktionen konstitutiv oder induzierbar exprimiert. In all diesen Fällen entstehen Viruspartikel, die zusätzlich zur HCV-Sequenz ein Resistenz- und/oder Reportergen tragen. Zum Auffinden von Zellen, in denen das HCV replizieren kann, werden diese Zellen mit den so hergestellten Viren infiziert und einer Antibiotikumselektion unterzogen oder, 40 in Abhängigkeit vom HCV-RNA-Konstrukt, mittels Nachwels der Expression des Reportergens untersucht. Da eine Antibiotikumresistenz bzw. eine Expression des Reportergens nur dann nachweisbar ist, wenn das HCV-RNA-Konstrukt repliziert, müssen die so gefundenen Zellen permissiv sein. Auf diese Weise lassen sich nahezu beliebige Zelllinien oder primäre Zellkulturen hinsichtlich der Permissivität testen und auffinden.
 - 45 • Das erfindungsgemäße Zellkultursystem erlaubt auch das gezielte Auffinden von HCV-RNA-Konstrukten, bei denen es auf Grund von Mutationen, die sich entweder zufällig im Rahmen der HCV-RNA-Replikation ereignen oder die gezielt in das Konstrukt eingeführt werden, zu einer Steigerung der Replikationseffizienz kommt. Solche Mutationen, die zu einer Veränderung der Replikation des HCV-RNA-Konstrukts führen, sind dem Fachmann als adaptive 50
- 55 [0034] Das erfindungsgemäße Zellkultursystem erlaubt auch das gezielte Auffinden von HCV-RNA-Konstrukten, bei denen es auf Grund von Mutationen, die sich entweder zufällig im Rahmen der HCV-RNA-Replikation ereignen oder die gezielt in das Konstrukt eingeführt werden, zu einer Steigerung der Replikationseffizienz kommt. Solche Mutationen, die zu einer Veränderung der Replikation des HCV-RNA-Konstrukts führen, sind dem Fachmann als adaptive

Mutationen bekannt. Die Erfindung umfaßt deshalb auch Verfahren zur Gewinnung von zellkultur-adaptierten Mutanten eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts gemäß vorstehender Beschreibung, wobei die Mutanten gegenüber dem originären HCV-RNA-Konstrukt eine erhöhte Replikationseffizienz aufweisen. Sie umfaßt desweiteren ein Verfahren zur Herstellung von Mutanten eines HCV-RNA-Vollängengenoms oder eines HCV-RNA-Teilgenoms oder eines beliebigen HCV-RNA-Konstrukts mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Vollängengenom oder -Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffizienz, sowie zellkultur-adaptierte Mutanten von HCV-RNA-Konstrukten, HCV-Vollängengenomen und HCV-Teilgenomen mit im Vergleich zu den ursprünglichen Konstrukten, Teil- oder Vollängengenomen erhöhter Replikationseffizienz.

5 [0035] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von zellkultur-adaptierten Mutanten eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts, wobei die Mutanten gegenüber dem HCV-RNA-Konstrukt eine erhöhte Replikations-10 effizienz aufweisen, ist dadurch gekennzeichnet, daß man ein Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen nach einem der Ansprüche 4 bis 19 ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte isoliert.

15 [0036] Bei einer vorteilhaften Weiterbildung dieses Herstellungsverfahrens werden die isolierten HCV-RNA-Konstrukte wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen eines Zellkultursystems nach Anspruch 1 eingeschleust, das dabei erhaltene Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial das Isolierte HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, die gewachsenen Zellklone geerntet und daraus die HCV-RNA-Konstrukte isoliert.

20 Mit dieser Verfahrensvariante kann der Grad der adaptiven Mutationen und damit der Grad der Replikationseffizienz in den betreffenden HCV-RNA-Konstrukten noch gesteigert werden.

[0037] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Mutanten eines HCV - Vollängengenoms oder eines HCV- Teilgenoms oder eines beliebigen HCV-RNA-Konstrukts mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV- Vollängengenom oder - Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffizienz zeichnet sich dadurch aus, daß man mit Hilfe eines der beiden vorstehend genannten Herstellungsverfahren eine zellkultur-adaptierte Mutante eines HCV-RNA-Konstrukts herstellt, diese aus den Zellen isoliert, mit im Stand der Technik bekannten Methoden kloniert und sequenziert und durch Vergleich mit der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukts die Art, Anzahl und Positionen der Mutationen bestimmt, und diese Mutationen dann entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, welche die betreffenden Mutationen enthalten, in ein (isoliertes) HCV-Vollängen- oder -teilgenom oder ein beliebiges HCV-RNA-Konstrukt einführt.

Zum Nachweis bzw. zur Verifizierung derjenigen Mutationen, die tatsächlich eine Veränderung der Replikation und insbesondere eine Replikationssteigerung bewirken, kann ein Test durchgeführt werden, bei dem die bestimmten Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche in das ursprüngliche HCV-RNA-Konstrukt eingeführt und dieses wiederum in Zellkultur eingeschleust wird. Wenn die eingeführte Mutation tatsächlich zu einer Steigerung der Replikation führt, sollte im Fall eines HCV-RNA-Konstrukts mit selektierbarem Marker gen die Zahl der resistenten Zellklone bei dem künstlich mutierten Konstrukt deutlich höher sein als bei dem unbehandelten Konstrukt. Im Fall eines Konstrukts mit einem Reportergen sollte die Aktivität bzw. Menge des Reporters bei dem künstlich mutierten Konstrukt deutlich höher sein als bei dem unbehandelten.

[0038] Die erfindungsgemäßen zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukte mit hoher Replikationseffizienz sind dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche von einem HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 19 ableitbar sind und daß sie mit einem der beiden vorstehend genannten Herstellungsverfahren erhältlich sind.

[0039] Diese zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukte können dazu verwendet werden, beliebige HCV-RNA-Konstrukte oder HCV-Vollängen- oder Teilgenome mit erhöhter Replikationseffizienz herzustellen. Dabei können sowohl Konstrukte mit einem selektierbaren Resistenzgen als auch Konstrukte ohne ein solches bzw. mit einem nicht-selektierbaren Reportergen (z.B. Luziferase) hergestellt werden, denn aufgrund der sehr hohen Replikationseffizienz des zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukts kann dessen Replikation auch in nicht-selektionierten Zellen nachgewiesen werden.

Die erfindungsgemäßen zellkultur-adaptierten Mutanten eines HCV-RNA-Konstrukts oder eines HCV-Vollängengenoms oder eines HCV-Teilgenoms mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukt oder dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom erhöhter Replikationseffizienz, sind dadurch charakterisiert, daß sie mit einem Verfahren erhältlich sind, bei dem man in einem zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukt durch Sequenzanalyse und Sequenzvergleich die Art und Anzahl der Mutationen bestimmt und diese Mutationen in ein HCV-RNA-Konstrukt, insbesondere in ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 4 bis 19, oder in ein (isoliertes) HCV-RNA-Vollängengenom einführt, entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten.

[0040] Eine Gruppe ganz bevorzugter HCV-RNA-Konstrukte, HCV-Vollängengenome und HCV-Teilgenome mit hoher und sehr hoher Replikationseffizienz und infolgedessen sehr guter Eignung für die praktische Anwendung ist

EP 1 043 399 A2

dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere oder alle der in Tabelle 3 aufgelisteten Aminosäure- bzw. Nukleotidaustausche und/oder einen oder mehrere der folgenden Aminosäureaustausche aufweist: 1283 arg -> gly , 1383 glu -> ala , 1577 lys -> arg , 1609 lys -> glu , 1936 pro -> ser , 2163 glu -> gly , 2330 lys -> glu , 2442 ile -> val. (Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen des Polyproteins des HCV-Isolats con1, siehe Tabelle 1).

5

Besondere Eigenschaften der in den Sequenzprotokollen angegebenen Sequenzen:

SEQ ID-NO: 1

10 [0041]

Name: I389/Core-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

- 15 1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
- 20 4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
- 25 9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
- 30 14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 2

35 [0042]

Name: I337/NS2-3'/wt

Aufbau (Nukleotidpositionen):

- 40 1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1181: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1190-1800: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
- 45 4. 1801-8403: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 2 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1801-2451: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
6. 2452-4344: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
7. 4345-4506: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
- 50 8. 4507-5289: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
9. 5290-6630: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
10. 6631-8403: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
11. 8407-8637: HCV 3' nicht-translatierte Region

55

SEQ ID-NO: 3

[0043]

- 5 Name: I389/NS3-3'/wt
Aufbau (Nukleotidpositionen):
1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
10 3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B
15 5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
10. 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

20 SEQ ID-NO: 4

[0044]

- 25 Name: I337/NS3-3'/wt
Aufbau (Nukleotidpositionen):
1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1181: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
30 3. 1190-1800: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1801-7758: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1801-3696: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
35 6. 3697-3858: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
7. 3859-4641: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4642-5982: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5983-7755: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
10. 7759-7989: HCV 3' nicht-translatierte Region

40 SEQ ID-NO: 5

[0045]

- 45 Name: I389/NS2-3'/wt
Aufbau (Nukleotidpositionen):
1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
50 3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-8418: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 2 bis Nichtstrukturprotein 5B
5. 1813-2463: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
6. 2464-4356: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
55 7. 4357-4518: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
8. 4519-5301: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
9. 5302-6642: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)

EP 1 043 399 A2

10. 6643-8415: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
11. 8419-8649: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 6

5

[0046]

Name: I389/NS3-3'/9-13F
Aufbau (Nukleotidpositionen):

10

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
15. 4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 9-13F
5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
20. 7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001; HCV 3' nicht-translatierte Region

25 **SEQ ID-NO: 7**

[0047]

Name: I389/Core-3'/9-13F
Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
35. 4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 9-13F
5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
40. 7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
45. 12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

50 **SEQ ID-NO: 8**

[0048]

Name: I389/NS3-3'/5.1
Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker

EP 1 043 399 A2

3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters

4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 5.1

5

5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase

6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor

7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)

8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)

10

9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 9

15 [0049]

Name: I389/Core-3'/5.1

Aufbau (Nukleotidpositionen):

20

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region

2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker

3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters

4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 5.1

25

5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein

6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein

7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein

8. 4051-4239: Protein p7

30

9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease

10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase

11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor

12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)

13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)

35

14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase

15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 10

40 [0050]

Name: I389/NS3-3'/19

Aufbau (Nukleotidpositionen):

45

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region

2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker

3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters

50

4. 1813-7767: HCV Polyprotein von Nichtstrukturprotein 3 bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 19

5. 1813-3708: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase

6. 3709-3870: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor

7. 3871-4653: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)

8. 4654-5994: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)

55

9. 5995-7767: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase 7771-8001: HCV 3' nicht-translatierte Region

SEQ ID-NO: 11

[0051]

- 5 Name: I389/Core-3'/19
Aufbau (Nukleotidpositionen):

1. 1-341: HCV 5' nicht-translatierte Region
2. 342-1193: HCV Core Protein-Neomycin Phosphotransferase Fusionsprotein; selektionierbarer Marker
10 3. 1202-1812: Interne Ribosomenbindungsstelle des Encephalomyokarditis Virus; erlaubt die Translation des dahinterliegenden HCV offenen Leserasters
4. 1813-10842: HCV Polyprotein von Core bis Nichtstrukturprotein 5B der zellkultur-adaptierten Mutante 19

15 5. 1813-2385: HCV Core Protein; Strukturprotein
6. 2386-2961: Hüllprotein 1 (envelope protein 1); Strukturprotein
7. 2962-4050: Hüllprotein 2 (envelope protein 2); Strukturprotein
8. 4051-4239: Protein p7
9. 4240-4890: Nichtstrukturprotein 2 (NS2); HCV NS2-3 Protease
10. 4891-6783: Nichtstrukturprotein 3 (NS3); HCV NS3 Protease/Helikase
20 11. 6784-6945: Nichtstrukturprotein 4A (NS4A); NS3 Protease Kofaktor
12. 6946-7728: Nichtstrukturprotein 4B (NS4B)
13. 7729-9069: Nichtstrukturprotein 5A (NS5A)
14. 9070-10842: Nichtstrukturprotein 5B (NS5B); RNA-abhängige RNA-Polymerase
15. 10846-11076: HCV 3' nicht-translatierte Region

25 [0052] Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehörigen Tabellen und Figuren näher erläutert. Die erwähnten Figuren zeigen

30 **Fig. 1 A:** Die Struktur eines erfindungsgemäßen HCV-RNA-Konstrukts Ganz oben ist eine schematische Darstellung der Struktur des kompletten parentalen HCV-Genoms gegeben mit den Positionen der Gene für die Spaltungsprodukte core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B innerhalb des Polyproteins, und den 5' und 3' nichttranslatierten Regionen (5' NTR und 3' NTR) — als Horizontalbalken dargestellt —, und mit den beiden für die Erzeugung der Subgenom-Konstrukte ausgewählten Positionen, nämlich der Position der 'GDD-katalytischen Domäne' der NS5B RNA Polymerase (GDD) und der Position der 3' Grenze der HCV-IRES (Nukleotidpositionen 1 bis 377 bzw. 1 bis 389) — oberhalb des Genomschemas eingezeichnet —. Die Zahlen unterhalb des Genomschemas bezeichnen die entsprechenden Nukleotidpositionen.
Darunter sind schematische Darstellungen der Strukturen zweier erfindungsgemäßer, modifizierter HCV-RNA-Konstrukte (Subgenom) gezeigt, bestehend aus der 5' HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (Neo^R), der EMCV-IRES (E-I) und den HCV Sequenzen von NS2 bzw. NS3 bis zum authentischen 3' Ende. Die Position der das NS5B Polymerase GDD-Motiv umfassenden 10 Aminosäuren-Deletion ist jeweils mit einem Dreieck (Δ) markiert.

35

40 **Fig. 1 B:** Das Ergebnis einer denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von replizierter Plusstrang-RNA in transfizierten subpassagierten Huh-7 Zellklonen.
Die Positionen der HCV-spezifischen RNAs (Pfeile) und der 28S rRNA sind rechts von Spur 12 angegeben, die Größen (Anzahlen der Nukleotide) der RNA-Marker (M) sind links von Spur 1 angegeben.

45 **Fig. 1 C** : Das Ergebnis eines PCR-Tests mit nachfolgendem Southern-Blot zum Nachweis der Abwesenheit von integrierter Replikon-DNA in den meisten der selektierten Zellklone.
Spuren 1 und 2 zeigen die Positivkontrolle, Spur 13 die Negativ-Kontrolle. Die Zahlenangaben links der Spur 1 bezeichnen die Größe der Nukleotid-Marker-Moleküle.

50 **Fig. 2 A:** Das Ergebnis eines PCR-Tests mit nachfolgendem Southern-Blot zum sensitiven Ausschluß integrierter Replikon-DNA (Plasmid Moleküle I₃₇₇/NS3-3'/wt) in einem HCV-RNA-Konstrukt-haltigen Zellklon (9-13). Die Spuren 7 bis 11 repräsentieren das Ergebnis einer Titration von DNA-Molekülen des Konstrukts I₃₇₇/NS3-3'/wt ohne Zugabe von Gesamt-DNA des Zellklons 9-13 und die Spuren 2 - 6 repräsentieren die gleichen Plasmidmoleküle mit Zugabe von jeweils 1 µg 9-13 DNA vor der PCR (zwecks Ausschluß

EP 1 043 399 A2

eines Inhibitors der PCR in der DNA-Präparation). Spur 13 repräsentiert die Negativ-Kontrolle (PCR ohne DNA-Sonde). Spur 1 zeigt das Ergebnis, das mit einem µg Gesamt-DNA des Zellkons 9-13 erhalten wurde.

- 5 **Fig. 2 B:** Das Ergebnis eines Northern-Blot-Tests zur Quantifizierung von HCV Plus- und Minusstrang RNA. Die Pfeile markieren die Positionen von Replikon-RNA. Die "plus" und "minus"-Abgaben bezeichnen die positive (plus) bzw. negative (minus) Polarität der RNA-Kontrollen, die auf das Gel aufgetragen wurden. "Minusstrand" und "Plusstrand" bezeichnen die Spezifität der radioaktiven RNA-Sonden.
- 10 **Fig. 2 C:** Ergebnis einer Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese nach radioaktiver Markierung der intrazellulär replizierten HCV-RNA zum Nachweis der Resistenz der HCV-RNA-Replikation gegen Dactinomycin.
- 15 **Fig. 3 A:** Nachweis von HCV-spezifischen Antigenen in den selektierten Zellklonen mittels Immunopräzipitation nach metabolischer Radioaktivmarkierung. Die Spuren 7 - 9 repräsentieren authentische Größenmarker (die nach transienter Expression eines HCV-RNA-Konstrukts in Huh-7-Zellen erhalten wurden); identifizierte HCV-Proteine sind am linken Rand von Spur 1 markiert, die Molekulargewichte (in Kilodalton) sind am rechten Rand von Spur 9 angegeben.
- 20 **Fig. 3 B:** Ergebnisse eines Immunfluoreszenztests zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von HCV Antigenen.
- 25 **Fig. 4:** Schematische Darstellung der Struktur eines erfindungsgemäßen selektierbaren HCV-RNA-Konstrukts (komplettes Genom) bestehend aus der 5' HCV-IRES, dem Neomycinphosphotransferasegen (NeoR), einem heterologen IRES-Element, z.B. des Encephalomyocarditisvirus (E-I), dem vollständigen HCV-Leseraster und der authentischen 3' NTR.
- 30 **Fig. 5:** Schematische Darstellung der Struktur von HCV-RNA-Konstrukten mit insertiertem Antibiotikumresistenzgen (A) innerhalb der für das Polyprotein kodierenden Nukleotidsequenz (monocistronische RNA), und (B) innerhalb der 3' NTR (bicistronische RNA).
- 35 **Fig. 6:** Schematische Darstellung der Struktur von HCV-RNA-Konstrukten mit insertiertem Reportergen (A) als Teil eines HCV-Replikons von NS3 bis NS5B; — das Reporterprotein wird letztendlich durch virale oder durch zelluläre Proteasen aus dem Polyprotein gespalten und das selektierbare Markerogen (Selektionsgen) bzw. das Resistenzgen durch Kontransfektion in die Zellen einschleust, (B) als Teil eines Fusionsgens aus Resistenz- und Reportergen (z.B. für die Neomycinphosphotransferase und green fluorescent Protein) (C) als Teil eines Replikons aus Resistenz- und Reportergen (z.B. für die Neomycinphosphotransferase und das green fluorescent Protein), die über eine Nukleotidsequenz verbunden sind, welche für eine Aminosäuresequenz kodiert (schräffierter Bereich), die von einer Protease gespalten werden kann oder die über eine selbstspaltende (autokatalytische) Aktivität verfügt, (D) als unabhängiges Gen (hier green fluorescent protein), das von einer eigenen internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) aus exprimiert wird; — das Resistenzgen (hier: Neomycinphosphotransferase-Gen) wird davon unabhängig ebenfalls von einer eigenen internen Ribosomenbindungsstelle (IRES) aus exprimiert (polycistronisches Konstrukt).
- 40 **Fig. 7:** Schematische Darstellung der Struktur eines HCV-RNA-Konstrukts bei dem das Resistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA-Sequenz verbunden ist. Die dicken Linien stellen die HCV 5' und 3' NTRs dar, E-I ist eine heterologe interne Ribosomenbindungsstelle, die für die Expression des Resistenzgens notwendig ist, und das graue Quadrat stellt das Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym dar.
- 45 **Fig. 8:** Schematische Darstellung der Struktur eines HCV-RNA-Konstrukts mit Resistenzgen und integriertem Fremdgen.
- 50 **Fig. 9:** Methodisches Vorgehen zum Vergleich der spezifischen Infektiosität (ausgedrückt als Anzahl gebildeter Zellkolonien) von Gesamt-RNA versus in vitro Transkripte. HCV-RNA wird mittels in vitro Transkription eines entsprechenden RNA-Konstrukts hergestellt und durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD 260 nm) quantifiziert. Eine definierte Anzahl dieser Moleküle wird mit einer bestimmten Menge Gesamt-RNA von naiven Huh-7 Zellen gemischt und diese Mischung mit Hilfe der Elektroporation in

naïve Huh-7 Zellen eingeschleust. Parallel dazu wird die Gesamt-RNA eines Zellklons, der mit der in Figur 1 beschriebenen Methode hergestellt wurde, mit einem im Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert und die Menge der darin enthaltenen HCV-RNA mittels Northern-blot unter Verwendung einer HCV-spezifischen RNA-Sonde und anschließender Quantifizierung mittels Phosphoimager bestimmt. Eine definierte Menge dieser Gesamt-RNA wird analog den in vitro Transkripten in naïve Huh-7 Zellen transfiziert. Diese Zellen in beiden Ansätzen werden danach einer G418-Selektion unterzogen und die Anzahl der gebildeten Kolonien durch Auszählen nach fixieren und anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blau bestimmt. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wird jedem Transfektionsansatz 1 μ g eines Plasmids zugesetzt, das die Expression der Luziferase erlaubt. Ein Aliquot der transfizierten Zellen wird nach 24 Stunden geerntet und die Luziferaseaktivität im jeweiligen Zellysat bestimmt. Die Anzahl der Kolonien wird jeweils auf die Luziferaseexpression normiert.

Fig. 10: Sequenzanalyse der 9-13 Klone. Gesamt-RNA des Zellklons 9-13, der durch Transfektion des HCV-RNA-Konstrukts I377/NS3-3' entstand, wurde mit einem im Stand der Technik bekannten Verfahren isoliert und das HCV-RNA-Konstrukt von Nukleotidposition 59 bis 9386 mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' unter Verwendung der primer S59 und A9413 amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden kloniert und 11 Klone (genannt 9-13 A - K) vollständig sequenziert, wobei sich die Klone D und I, E und G sowie H und J als identisch erwiesen. Die Positionen der Aminosäureunterschiede in der NS3-5B Region zwischen den reklierten HCV-RNAs und dem parentalnen Konstrukt sind mit einem dicken vertikalen Strich beim jeweiligen Klon markiert. Jeder Klon wurde mit dem Restriktionsenzym *Sfi* I verdaut und das jeweilige Fragment in das parentale Konstrukt inseriert. Diese Klone wurden jeweils in Huh-7 Zellen transfiziert und die Zellen wie in Figur 1 beschrieben einer Selektion unterzogen. Die Anzahl der mit jedem Konstrukt erhaltenen Zellklone ist rechts neben dem jeweiligen Konstrukt vermerkt.

Fig. 11 A: Prinzip der Replikationsbestimmung mit Hilfe eines Reportergens. Im oberen Teil der Figur ist das HCV-DNA-Konstrukt I₃₈₉/Luc/NS3-3' dargestellt, bestehend aus der HCV 5' NTR (Nukleotidposition 1-389), dem Luziferasegen (luc), der IRES des Encephalomyocarditis Virus, dem HCV NS3-5B und der 3' NTR. Die Position des aktiven Zentrums der NS5B RNA-Polymerase, in das ein inaktivierender Aminosäureaustausch eingeführt wurde, ist mit 'GND' angedeutet. Die Plasmide, die für das replikationskompetente bzw. das defekte HCV-RNA-Konstrukt kodieren, werden mit dem Restriktionsenzym *Sca* I verdaut und in eine in vitro Transkription mit der T7 RNA-Polymerase eingesetzt. Nach Entfernung der Matrizen-DNA werden die jeweiligen HCV-RNA-Konstrukte mittels Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust und diese in regelmäßigen Abständen geerntet.

Fig. 11 B: Vergleich der Luziferaseaktivitäten in Zellen transfiziert mit dem parentalnen HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/Luc/NS3-3'/wt (wt) oder den folgenden Varianten: Der inaktiven RNA (318 DN), der Variante 9-13F oder der Variante 5.1. Die Zellen wurden 6 (nicht gezeigt), 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden nach der Transfektion geerntet und die Luziferaseaktivitäten luminometrisch bestimmt.

Fig. 12: Selektionierbare HCV-Vollängengenome (Konstrukte I₃₈₉/core-3'/5.1 und I₃₈₉/core-3'/9-13F).

(A) Schematische Darstellung des Vollängenkonstrukts. Der Bereich zwischen den beiden ange deuteten Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym *Sfi* I entspricht den Sequenzen der hoch adaptierten RNA-Varianten 5.1. oder 9-13F.
(B) Anzahl der Kolonien die nach Transfektion von jeweils 0,1 μ g in vitro transkribierter RNA der unter A dargestellten Konstrukte I₃₈₉/core-3'/5.1 in HUH7-Zellen erhalten wurden. Angegeben ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.
(C) Nachweis autonom replizierender HCV-Vollängen-RNAs in G418-resistenten Zellklonen, die nach Transfektion des entsprechenden in vitro Transkripts erhalten wurden. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm eines Northern Blots, der mit einer Sonde gegen das neo-Resistenzgen und der HCV 5' NTR hybridisiert wurde. Die in Spur 1 und 2 dargestellten Kontrollen entsprechen jeweils 10⁸ Molekülen der angegebenen in vitro Transkripte, gemischt mit Gesamt-RNA aus naiven Huh-7 Zellen. Die Negativkontrolle enthält ausschließlich Gesamt RNA aus naiven Huh-7 Zellen (Spur 3). Die Spuren 4-9 enthalten 3-10 μ g Gesamt-RNA aus G418-resistenten Zellklonen, die nach Transfektion von in vitro transkribierter I₃₈₉/core-3'/5.1-RNA bzw. I₃₈₉/core-3'/9-13F-RNA erhalten wurden. Die für die Selektion verwendete G418-Konzentration ist jeweils angegeben. Fünf der dargestellten Zellklone enthalten die hoch adaptierte RNA-Variante 5.1 (Spur 4-8), einer die adaptierte RNA-Variante 9-13F (Spur 9).

- Fig. 13: HCV-RNA-Konstrukte mit einem Reportergen. (A) Bicistronische HCV-RNA-Konstrukte. Das Reportergen wird mit Hilfe einer separaten IRES translatiert. (B) Monocistronische HCV-RNA-Konstrukte. Das Reportergenprodukt wird als Fusionsprotein mit einem HCV-Protein exprimiert. Die beiden Anteile sind über eine Erkennungssequenz für eine virale oder zelluläre Protease verbunden, die eine proteolytische Trennung der beiden fusionierten Proteinanteile erlaubt. Im gezeigten Beispiel wurden das Reportergenprodukt und das jeweilige HCV-Protein über eine Erkennungssequenz für Ubiquitin (Ub) fusioniert.
- Fig. 14: Tricistronisches Vollängen HCV-RNA-Konstrukt, das zusätzlich zum Resistenzgen ein Fremdgen inseriert besitzt.
- Fig. 15: Monocistronische HCV-RNA-Konstrukte, bei denen das Resistenzgenprodukt als Fusionsprotein mit dem HCV-Anteil exprimiert wird. Das Resistenzgen (RG) ist entweder als Fusionsprotein aktiv oder es wird so mit einer proteolytisch spaltbaren Sequenz mit dem HCV-Anteil fusioniert, daß das Resistenzgenprodukt durch eine zelluläre oder virale Protease vom HCV-Anteil abgespalten wird. Im gezeigten Beispiel wurde das Resistenzgen über die für Ubiquitin (Ub) kodierende Sequenz mit dem jeweiligen HCV-Anteil fusioniert.

Beispiel 1: Herstellung von HCV-RNA-Konstrukten

20 (A) Synthese und Klonierung eines vollständigen HCV-Konsensusgenoms mittels RT- PCR

[0053] Aus der Leber eines chronisch infizierten Patienten wurde das HCV-Genom, d.h. die HCV-RNA wie nachfolgend beschrieben isoliert:

[0054] Aus ca. 100 mg Leber wurde die komplette RNA gemäß dem Verfahren von Chomczynski und Sacci (1987, Anal. Biochem. 162, 156) isoliert. Mit 1 µg dieser isolierten RNA wurde eine reverse Transkription mit den Primern A6103 (GCTATCAGCCGGTTCATCCACTGC) oder A9413 (CAGGATGGCCTATTGG CCTGGAG) und dem 'expand reverse transcriptase'- System (Boehringer Mannheim, Deutschland) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Mit den Produkten dieser reversen Transkription (RT) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR=polymerase chain reaction) durchgeführt, und zwar unter Verwendung des 'expand long template'-Systems (Boehringer Mannheim, Deutschland), wobei der Puffer mit 2% Dimethylsulfoxid-Gehalt eingesetzt wurde. Nach einer Stunde bei 42°C wurde 1/8 dieses Reaktionsansatzes in einem ersten PCR-Durchgang mit den Primern A6103 und S59 (TGTCTTCACGCA-GAAAGCGTAGCTAG) oder A9413 und S4542 (GATGAGCT CGCCGCGAAGCTGTCC) eingesetzt. Nach 40 Zyklen wurde 1/10 dieses Reaktionsansatzes in einem zweiten PCR-Durchgang mit den Primern S59 und A4919 (ACCACAGCCCGCGTCATAGCACTCG) oder S4542 und A9386 (TTAGCTCCCCG TTCATCGGTTGG) eingesetzt. Nach 30 Zyklen wurden die PCR-Produkte mittels präparativer Agarose-Gel-Elektrophorese gereinigt und die dabei eluierten Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) oder pBSK II (Stratagene) ligiert. Vier Klone von jedem Fragment wurden analysiert und sequenziert, und es wurde eine Konsensus-Sequenz ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Sequenzen miteinander verglichen. Die Positionen, an denen sich die Sequenz eines der Fragmente von den übrigen unterschied, wurde als unerwünschte Mutation betrachtet. Im Fall von Mehrdeutigkeiten der Sequenz wurden kürzere sich überlappende PCR-Fragmente der betreffenden Region amplifiziert und mehrere Klone sequenziert. Auf diese Weise konnten zahlreiche potentielle Mutationen in jedem Fragment identifiziert und somit eine isolat-spezifische Konsensussequenz etabliert werden. Diese etablierte Konsensussequenz bzw. dieses Genom gehört zum weltweit verbreiteten Genotyp 1b. Die nicht translatierte Region am 3'-Ende (=3' NTR) wurde mittels konventioneller PCR erhalten, wobei ein Antisense-Primer eingesetzt wurde, der die letzten 24 Nukleotide des im Stand der Technik bekannten 'X-tails' (Tanaka et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 744; und Rice, PCT/US 96/14033) abdeckt. Die authentische nicht translatierte Region am 5'-Ende (=5' NTR) strangabwärts vom T7 Promotor wurde mittels PCR erzeugt, wobei zum einen ein Oligonukleotid verwendet wurde, das einem verkürzten T7 Promotor (TAA TAC GAC TCA CTA TAG) und den ersten 88 Nukleotiden von HCV entspricht, und zum anderen eines der vorgenannten Plasmide eingesetzt wurde, das eines der 5' Fragmente des Genoms trägt. Aus den subgenomischen Fragmenten mit der geringsten Anzahl an Nicht-Konsensus-Austauschen wurde ein komplettes HCV-Konsensusgenom zusammengesetzt und in einen modifizierten pBR322-Vektor insertiert. Abweichungen von der Konsensussequenz wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese ("site-directed mutagenesis") beseitigt. Um "run-off"-Transkripte mit einem authentischen 3' Ende herzustellen, wurde die 3'-NTR der Isolate (mit dem Ende TGT) zu AGT modifiziert (gemäß der Sequenz vom Genotyp 3 = Klon 'WS' nach Kolyhalov et al., 1996, J. Virol. 70, 3363) und außerdem wurde ein zusätzlicher Nukleotidaustausch an Position 9562 vorgenommen, um die A:T Basenpaarung in der Haarnadelstruktur am 3' Ende der 3' NTR (Kolyhalov et al. ibid.) beizubehalten. Um eine interne Restriktionsstelle für das Enzym Scal zu beseitigen, wurde ferner ein sog. stiller ("silent") Nukleotidaustausch vorgenommen. Nach dem Zusammenfügen des Vollängen-Genoms mit passenden 5'- und 3' NTRen wurde die komplette HCV-Sequenz überprüft. Dabei wurde kein ungewünschter Nukleotidaustausch

gefunden.

[0055] Das auf diese Weise hergestellte HCV-Genom sollte per Definition hepatotrop sein.

(B) Synthese selektierbarer HCV-Subgenom-Konstrukte

5

[0056] Unter Verwendung des unter (A) beschriebenen Konsensusgenoms wurden HCV-Subgenom-Konstrukte hergestellt, die das Antibiotikumresistenzgen Neomycin-Phosphotransferase (NPT) und zwei Sequenzen von internen Ribosomenbindungsstellen (IRES) enthalten. Die hierfür angewendeten biochemischen Verfahrenstechniken sind dem Fachmann bekannt und geläufig (siehe: Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989, Molecularcloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1-3, John Wiley & Sons Inc., New York). Das Antibiotikumresistenzgen wurde unmittelbar hinter der 5' NTR insertiert, wodurch eine bicistronische RNA erhalten wurde (siehe Fig. 1 A). Ebenso gut kann das Antibiotikumresistenzgen aber auch an anderer Stelle des HCV-Subgenom-Konstruktinsertiert werden, beispielsweise innerhalb der für das Polyprotein kodierenden Nukleotidsequenz, wodurch eine monocistronische RNA erhalten wird (siehe Fig. 5 A) oder in die 3' NTR (siehe Fig. 5 B). Bei den IRES-Elementen handelt es sich zum einen um eine der beiden HCV-IRES-Varianten Nukleotide 1-377 oder Nukleotide 1-389, und zum anderen um die IRES des Enzephalomyocarditis Virus, die die Translation der HCV Sequenz strangabwärts von den Genen für NS2 oder NS3 bis zu dem authentischen 3' Ende des Genoms steuert.

10

[0057] Die beiden genannten HCV-IRES-Varianten wurden wie folgt ermittelt: Auf der Basis von Deletionsanalysen der 3' Grenze der HCV-IRES (Reynolds et al. 1995, *EMBO J.* 14, 6010) wurden verschiedene Abschnitte der 5' NTR mit dem NPT Gen fusioniert und anhand von Kotransfektionen mit einem das T7 RNA Polymerase Gen enthaltenden Plasmid hinsichtlich der maximalen Anzahl gebildeter Kolonien analysiert. Die besten Ergebnisse wurden mit den HCV Sequenzen von 1-377 und 1-389 erhalten. Da sich das AUG-Startkodon des HCV Polyproteins an Position 342 befindet und somit in der IRES-Sequenz enthalten ist, kommt es zu einer Fusion von 12 bzw. 16 Aminosäuren des HCV-Kapsidproteins ("Core-Proteins") mit der Neomycin Phosphotransferase (siehe Fig. 1 A).

15

[0058] Diese modifizierten HCV-Subgenom-Konstrukte erhielten dementsprechend die Bezeichnungen I₃₇₇/NS2-3' (oder I₃₇₇/NS3-3') und I₃₈₉/NS2-3' (oder I₃₈₉/NS3-3'). Sie sind in Fig. 1A schematisch dargestellt.

20

[0059] Mit in-vitro-Transkripten dieser modifizierten parentalen HCV-Subgenom-Konstrukte I₃₇₇/NS2-3' (oder I₃₇₇/NS3-3') und I₃₈₉/NS2-3' (oder I₃₈₉/NS3-3') wurden verschiedene Zelllinien und Primärzellkulturen von menschlichen Hepatocyten transfiziert.

25

[0060] Als parallele Négativ-Kontrolle zu allen Transfektionsexperimenten wurde zu jedem modifizierten parentalen HCV-Subgenom-Konstrukt ein entsprechend modifiziertes aber defektes Subgenom konstruiert, das sich von dem parental dadurch unterscheidet, daß es innerhalb des Leserasters eine Deletion von 10 Aminosäuren aufweist, die das aktive Zentrum der NS5B RNA Polymerase umfaßt (Behrens et al., 1996, *EMBO J.* 15, 12; und Lohmann et al., 1997, *J. Virol.* 71, 8416).

30

35

(C) Synthese selektierbarer HCV-Genom-Konstrukte

40

[0061] Ein NS2-3' Subgenomkonstrukt, das am 5' Ende mit einem Fragment des Luziferasegens und der vollständigen EMCV-IRES verbunden ist, wurde mit Ncol und Spel restringiert und mittels präparativer Agarosegelektrophorese gereinigt. Der so erhaltene Vektor wurde in einer 3-Faktor Ligation mit einem Ncol/NotI-HCV-Fragment, entsprechend den Nukleotidpositionen 342 bis 1968 des HCV-Genoms und mit einem NotI/Spel-Fragment, entsprechend den Nukleotidpositionen 1968-9605 ligiert. Das entstandene Konstrukt, bei dem das vollständige HCV-Leseraster und die 3' NTR stromabwärts dem Luziferasegenfragment und der EMCV-IRES liegen, wurde danach mit Pmel und Spel restringiert und mit dem analog restringierten I₃₈₉/NS3-3'/wt-Subgenomkonstrukt-Vektor ligiert. Dieses selektionierbare HCV-Genomkonstrukt ist in Fig. 4 dargestellt.

45

(D) Herstellung von den HCV-RNA-Konstrukten entsprechenden In-vitro-Transkripten

50

[0062] Die vorstehend beschriebenen gereinigten Plasmid DNAs wurden mit Scal linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Präzipitation in eine In-vitro-Transkriptionsreaktion eingesetzt unter Verwendung der folgenden Komponenten: 80 mM HEPES, pH 7.5, 12,5 mM MgCl₂, 2 mM Spermidin, 40 mM Dithiothreitol, 2 mM von jedem NTP, 1 Einheit RNasin/ μ l, 50 μ g/ml restringierte DNA und ca. 2 Einheiten/ μ l T7 RNA Polymerase. Nach 2 Std. bei 37°C wurde die Hälfte der Menge an T7 Polymerase zugegeben und der Reaktionsansatz weitere 2h inkubiert. Zur Entfernung von DNA wurde die Mischung mit saurem Phenol extrahiert (U. Kedzierski, J.C. Porte, 1991, *Bio Techniques* 10, 210), mit Isopropanol präzipitiert, das Pellet in Wasser gelöst und mit DNase (2 Einheiten pro μ g DNA) für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Extraktion mit saurem Phenol, saurem Phenol/Chloroform und Chloroform und Isopropanol-Präzipitation wurde die gelöste RNA mittel optischer Dichtemessungen quantifiziert und

ihrer Unversehrtheit mittels Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Beispiel 2: Transfektionsexperimente mit der Hepatomazelllinie Huh-7

- 5 [0063] Bei sämtlichen Transfektionsexperimenten wurde sorgfältig darauf geachtet, daß jegliche Matrizen-DNA zuvor entfernt worden war, um zu vermeiden, daß solche DNA in transfizierte Zellen integrieren und diesen unabhängig von einer HCV-Replikation eine Neomycin-Resistenz vermittelten könnte. Deshalb wurde im Anschluß an die in-vitro-Transkription (Beispiel 1 D) die Reaktionsmischung mit 2 Einheiten DNase pro µg DNA für 60 Min. bei 37°C behandelt und mit saurem Phenol, saurem Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Vor der Verwendung für die Transfektion wurde die präzipitierte RNA mittels Formaldehyd Agarose Gel Elektrophorese analysiert.
- 10 [0064] Es wurden drei separate Transfektionsexperimente mit der hoch differenzierten humanen Hepatomazelllinie Huh-7 (gemäß Nakabayashi et al. 1982, *Cancer Res.* 42, 3858) durchgeführt. Dabei wurde jeweils 15 µg RNA in 8 x 10⁶ Huh-7-Zellen mit Hilfe der Elektroporation eingebracht und diese Zellen anschließend in Kulturschalen von 10 cm Durchmesser ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurde Neomycin (= G418) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugegeben. Das Kulturmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Nach 3 - 5 Wochen waren kleine Kolonien erkennbar, die isoliert und unter den gleichen Kulturbedingungen passagiert wurden.
- 15 [0065] Die Zellklone, die im Verlauf des ersten Experiments erhalten wurden, wurden isoliert und subpassagiert. Während dieser Prozedur starben die meisten Klone und die Endausbeute betrug nur noch 9 Klone von Zellen, die mit den parentalen HCV-Subgenom-Konstrukten transfiziert worden waren und 1 Klon (Klone 8-1) von Zellen, die mit einem defekten HCV-Genom-Konstrukt, nämlich einer defekten NS2-3' HCV-RNA transfiziert worden waren. Außer einer verkürzten Verdopplungszeit und dem gelegentlichen Auftreten von irregulär geformten Zellen wurden keine beständigen morphologischen Unterschiede zwischen diesen 9 Zellklonen und dem einen Zellklon (Klon 8-1) oder den parentalen Huh-7 Zellen gefunden.
- 20 [0066] Die Hauptkriterien für funktionierende HCV-Genomkonstrukte sind die Bildung von viraler RNA mit korrekter Größe und die Abwesenheit von (integrierter) Plasmid DNA, die eine G418-Resistenz übertragen bzw. vermitteln könnte.
- 25 [0067] Um die HCV-RNA in den Huh-7-Zellen zu bestimmen, wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels des gängigen Northern-Blot Verfahrens unter Verwendung einer Plusstrang-spezifischen Ribosonde (= RNA-Sonde) analysiert. Hierfür wurde von den jeweiligen Zellklonen Gesamt-RNA nach der Methode von Chomczynski und Sacchi 1987,
- 30 [Anal. Biochem. 162, 156 isoliert, und 10 µg RNA, was dem Gesamt-RNA-Gehalt von 0,5 - 1 x 10⁶ Zellen entspricht, mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Spuren 3 bis 12 der Fig. 1 B). Als Größenmarker mit authentischer Sequenz wurden gleichzeitig 10⁹ in-vitro-Transkripte (ivtr.), die zu den I₃₈₉/NS2-3'/wt oder den I₃₈₉/NS3-3'/wt Replikon-RNAs korrespondieren, mit aufgetrennt (Spur 1 bzw. Spur 2). Die aufgetrennte RNA wurde auf Nylon-Membranen transferiert und mit radioaktiv markierter Plusstrang-spezifischer RNA-Sonde, die komplementär zu dem kompletten NPT-Gen und der HCV-IRES von Nukleotid 377 bis Nukleotid 1 war, hybridisiert. Die Positionen der HCV-spezifischen RNAs (Pfeile) und der 28S rRNA sind rechts von Spur 12 angegeben, die Größen (Anzahlen der Nukleotide) der RNA-Marker sind links von Spur 1 angegeben. Die RNA Marker-Fragmente enthalten HCV-Sequenzen und hybridisieren deshalb mit der Ribosonde (= RNA-Sonde). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 1 B dargestellt.
- 35 [0068] Mit Ausnahme des mit dem defekten HCV-Genom-Konstrukt transfizierten Klons 8-1, lieferten alle Zellklone homogene HCV-RNAs korrekter Länge (ca. 8640 Nukleotide im Fall des NS2-3' und ca. 7970 Nukleotide im Fall des NS3-3' Replikons). Dieser Befund ist ein Indiz dafür, daß die funktionalen Replikons bzw. die funktionalen HCV-Genom-Konstrukte die G418 Resistenz übertragen. Um auszuschließen, daß die G418 Resistenz auf eine Plasmid-DNA zurückzuführen ist, die in das Genom der Huh-7 Wirtszelle integriert ist und unter der Kontrolle eines zellulären Promotors transkribiert wird, wurde von jedem Klon die DNA mittels einer NPT-Gen-spezifischen PCR untersucht. Hierbei wurde aus den selektierten Huh-7-Zellklonen die DNA mittels Verdau mit Proteinase K (40µg/ml, 1h, 37°C) in 10mMTris, pH7,5, 1mM EDTA, 0,5% SDS und anschließender Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Isopropanolpräzipitation isoliert. Das DNA-Präzipitat wurde in 10 mM Tris (pH 7,5) und 1 mM EDTA gelöst und 1 Stunde mit Rnase A inkubiert. Im Anschluß an eine Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol Präzipitation wurde 1 µg DNA, entsprechend 4 - 8 x 10⁴ Zellen, mittels PCR unter Einsatz NPT-Gen-spezifischer Primer (5'-TCAAGACCGACCTG TCCGGTGCCC-3' und 5'-CTTGAGCCTGGCGAACAGTCGGC-3') analysiert und ein DNA-Fragment bestehend aus 379 Nukleotiden erzeugt. Die Spezifität des PCR-Produkts wurde mittels Southern Blot Verfahren nachgewiesen, wobei ein Digoxigenin-markiertes DNA Fragment eingesetzt wurde, das zu dem NPT-Gen korrespondiert. Als Positiv-Kontrollen (zum Nachweis etwa vorhandener kontaminierender Nukleinsäuren) wurde das PCR-Verfahren mit 10⁷ Plasmid Molekülen oder 1 µg DNA aus einer BHK Zelllinie, die stabil mit einem Neomycin-Resistenz-Gen transfiziert war, durchgeführt, und als Negativ-Kontrolle wurde die PCR mit denselben Reagenzien aber ohne zugesetzte DNA durchgeführt.
- 40 Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Fig. 1 C dargestellt. Die Spuren 1 und 2 repräsentieren die Positiv-Kontrol-

len, Spur 13 repräsentiert die Negativ-Kontrolle. Die Zahlenangaben links der Spur 1 bezeichnen die Größe der Nukleotid-Marker-Moleküle. Außer in Klon 7-3 (Fig. 1C, Spur 3), der von Zellen nach Transfektion mit einem NS2-3' Replikon/NS2-3'HCV-Genom-Konstrukt stammt, und in Klon 8-1 (Fig. 1C, Spur 12), der von Zellen nach Transfektion mit einem defekten HCV-Genom-Konstrukt stammt, war in keinem Zellkton eine NPT-DNA nachweisbar. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz dafür, daß die G418 Resistenz der meisten Klone durch die replizierende HCV-RNA vermittelt wurde. Aber auch unabhängig von diesen Ergebnissen ist es unwahrscheinlich, daß HCV-RNAs mit korrekter Größe von integrierter Plasmid DNA erzeugt wird, denn die für die in-vitro-Transkription verwendeten Plasmide enthalten weder einen eukaryontischen Promotor noch ein Polyadenylierungssignal. Im Fall des Klons 7-3 ist die Resistenz deshalb höchst wahrscheinlich sowohl durch das HCV-RNA-Konstrukt bzw. die replizierende HCV-RNA als auch durch eine integrierte NPT DNA Sequenz vermittelt worden, während die Resistenz der Zellen von Klon 8-1 ausschließlich auf die integrierte Plasmid DNA zurückzuführen ist.

[0069] Um zu bestätigen, daß die G418 Resistenz von einer autonom replizierenden HCV-RNA vermittelt ist, wurde der Klon 9-13 (Fig. 1 B, Spur 11) weiteren Tests unterworfen. Klon 8-1, der Integrierte Kopien des NPT-Gens trägt, wurde überall als Negativkontrolle eingesetzt. Mit dem Ziel, die Anwesenheit von NPT-DNA im Klon 9-13 rigoros auszuschließen, wurde eine PCR durchgeführt, die den Nachweis von < 1000 NPT-Gen-Kopien in ~ 40.000 Zellen erlaubt. Das Ergebnis dieser PCR ist in Fig. 2A dargestellt. Im einzelnen wurde bei dieser PCR wie folgt verfahren: Es wurden jeweils 10^6 - 10^2 Plasmid Moleküle ($I_{377}/NS3-3'/wt$) entweder direkt (Spuren 7 - 11) oder nach Zugabe von jeweils 1 μ g 9-13 DNA (Spuren 2 - 6) in dem Test eingesetzt. Die Spezifität der amplifizierten DNA Fragment wurde mittels Southern Blot unter Verwendung einer NPT-spezifischen Sonde bestimmt. Eine PCR ohne DNA-Sonde wurde als Negativ-Kontrolle durchgeführt (Spur 12).

Selbst mit dieser sensitiven Methode wurde in einem μ g DNA des Zellklons 9-13 keine Plasmid DNA gefunden (Spur 1). Um die Menge an HCV Plus- und Minusstrang RNAs in diesen Zellen abzuschätzen, wurde eine Verdünnungsreihe von Gesamt-RNA mit dem Northern-Blot-Verfahren unter Verwendung einer Plus- oder Minusstrang-spezifischen radioaktiv markierten Ribosonde (= RNA-Sonde) analysiert. Hierfür wurden jeweils 8, 4 oder 2 μ g Gesamt-RNA, die aus den Zellklonen 9-13 und 8-1 isoliert worden waren, parallel zu bekannten Mengen analoger in-vitro-Transkripte mit Plus- oder Minusstrang-Polarität (Kontroll-RNAs) im Northern-Blot-Verfahren analysiert und anschließend einer Hybridisierung unterworfen. Die Hybridisierung wurde mit einer Plusstrang-spezifischen Ribosonde, die das komplett NPT-Gen und die HCV-IRES abdeckte ('plusstrand', obere Bildtafel), oder mit einer Minusstrang-spezifischen RNA-Sonde, die zu der NS3-Sequenz komplementär war ('minusstrand', untere Bildtafel) durchgeführt. Die Pfeile markieren die Positionen von Replikon-RNA. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 2 B dargestellt.

Im Fall des Plusstrangs würden ca. 10^8 Kopien/ μ g Gesamt-RNA nachgewiesen, was 1000 - 5000 HCV-RNA-Molekülen pro Zelle entspricht, während die Menge an Minusstrang-RNA 5- bis 10-fach niedriger war. Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, daß die Minusstrang RNA die replikative Zwischenform bzw. Zwischenkopie ist, die als Vorlage für die Synthese der Plusstrang Moleküle dient.

35 Da die Reaktion im wesentlichen von der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase katalysiert wird, sollte die Synthese der HCV-RNAs resistent gegen Dactinomycin sein, einem Antibiotikum, das selektiv die RNA-Synthese von DNA-Matrizen inhibiert, nicht jedoch die RNA-Synthese von RNA-Matrizen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Zellen mit [3 H]Uridin in Anwesenheit von Dactinomycin inkubiert, die radioaktiv markierten RNAs extrahiert, mittels denaturierender Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines handelsüblichen Bio-Imagers unter Verwendung einer [3 H]-sensitiven Bildplatte analysiert. Hierfür wurden jeweils ca. 5×10^5 Zellen der Klone 9-13 und 8-1 mit 100 μ Ci [3 H]Uridin für 16 Std. in Abwesenheit (-) oder Gegenwart (+) von 4 μ g/ml Dactinomycin (Dact) inkubiert. Im Anschluß an diese Markierungsreaktion wurde die Gesamt-RNA präpariert und mittels Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. In den beiden ersten Spuren ist nur 1/10 der Gesamt-RNA dargestellt. Die radioaktiv markierte RNA wurden mit einem BAS-2500 Bio-Imager (Firma Fuji) sichtbar gemacht.

45 Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Fig. 2 C dargestellt. In Übereinstimmung mit dem Inhibitor-Profil der NS5B Polymerase (Behrens et al., 1996, *EMBOJ.* 15, 12 und Lohmann et al., 1997, *J. Virol.* 71, 8416) war die Replikation der HCV RNA nicht durch Dactinomycin beeinflußt worden, während die Synthese von zellulärer RNA gehemmt worden war. Um die Identität der viralen RNA zu bestätigen, wurde eine RT-PCR zur Rekonstruktion der replizierten Sequenzen durchgeführt. Die Sequenzanalyse der rekonstruierten RNA zeigte, daß die RNA in dem Klon 9-13 HCV-spezifisch ist und mit dem transfizierten Transkript des HCV-Konstruktks $I_{377}/NS3-3'/wt$ übereinstimmt.

[0070] Zur Analyse der viralen Proteine wurden die betreffenden Zellen zunächst metabolisch mit [35 S] Methionin/Cystein radioaktiv markiert, anschließend lysiert und danach die HCV-spezifischen Proteine mittels Immunopräzipitation aus den Zell-Lysaten isoliert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Fig. 3 A dargestellt. Im einzelnen wurde dabei wie folgt verfahren: Zellen der Zellklone 9-13 (wt) und 8-1 (Δ) waren durch Behandlung für 16 Stunden mit einer 55 dem Fachmann geläufigen und im Handel erhältlichen Protein-Markierungs-Mischung (z.B. NEN Life Science) metabolisch radioaktiv markiert worden. Mittels Immunopräzipitation (IP) unter nicht-denaturierenden Bedingungen (z.B. nach Bartenschlager et al., 1995, *J. Virol.* 69, 7519) und unter Verwendung von drei verschiedenen Antisera (3/4, 5A, 5B, gemäß Markierung am oberen Ende der Spuren 1 bis 12) waren die HCV-spezifischen Proteine vom Zell-Lysat abge-

trennt worden.. Die Immunokomplexe wurden mittels Tricine SDS-PAGE analysiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Um authentische Größenmarker zu erhalten, wurde das homologe Replikikonstrukt I₃₇₇/NS3-3'/wt einer transienten Expression mit dem Vaccinia Virus T7-Hybrid System in Huh-7 Zellen unterworfen. Die dabei erhaltenen Produkte waren als Größenmarker (Spuren 7 - 9) parallel zu den Zellen der Klone 9-13 und 8-1 behandelt worden.

5 Identifizierte HCV-Proteine sind am linken Rand von Spur 1 markiert, die Molekulargewichte (in Kilodalton) sind am rechten Rand von Spur 9 angegeben. Es ist anzumerken, daß das verwendete NS3/4-spezifische Antiserum ('3/4') bevorzugt mit NS4A und NS4B reagiert, was zu einer Unterrepräsentation von NS3 führt.

[0071] Alle viralen Antigene waren eindeutig nachweisbar und ihre apparenten Molekulargewichte zeigten keine Abweichungen gegenüber denjenigen, die nach transakter Expression desselben bicistronischen HCV-RNA-Konstrukts in den ursprünglichen Huh-7 Zellen ermittelt wurden. Um die subzelluläre Verteilung der viralen Antigene zu bestimmen, wurde eine Immunofluoreszenz-Nachweisreaktion unter Einsatz von NS3- und NS5A-spezifischen Antisera durchgeführt (z.B. nach Bartenschlager et al., 1995, J. Virol. 69, 7519). Hierfür wurden Zellen der Klone 9-13 (wt) und 8-1 (Δ) 24 Std. nach dem Aussäen auf Deckgläsern mit Methanol/Azeton fixiert und mit polyklonalen NS3- oder NS5A-spezifischen Antisera inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit einem kommerziell erhältlichen FITC-15 konjugierten Anti-Kaninchen-Antiserum sichtbar gemacht. Zur Unterdrückung unspezifischer Fluoreszenzsignale wurden die Zellen mit dem Farbstoff 'Evans Blue' gegengefärbt.

[0072] Die Ergebnisse dieses Nachweistests sind in Fig. 3 B dargestellt. Mit beiden Antisera war eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma nachweisbar. Die NS5A-spezifischen Antisera führten außerdem zu einer schwachen Zellkern-Fluoreszenz, was darauf hindeutet, daß zumindest kleine Mengen dieses Antigens auch zum Zellkern gelangen.

20 Die generell dominierende Präsenz der viralen Antigene im Zytoplasma ist jedoch ein starkes Indiz dafür, daß die HCV-RNA Replikation im Zytoplasma stattfindet — so wie das bei den meisten RNA-Viren der Fall ist.

[0073] Diese Ergebnisse belegen klar, daß mit dem hier beschriebenen Versuchsansatz der Aufbau eines Zellkultursystems für das HCV gelungen ist, dessen Effizienz alles bisher bekannte um Größenordnungen übersteigt und erstmalig den Nachweis viraler Nukleinsäuren und Proteine mit konventionellen und bewährten biochemischen Methoden 25 erlaubt. Erst diese Effizienz erlaubt überhaupt detaillierte Untersuchungen der HCV-Pathogenese, genetische Analysen verschiedener HCV-Funktionen und ein genaues Studium der Virus-/Wirtszellwechselwirkungen, wodurch sich neue Ansatzpunkte für die Entwicklung einer antiviralen Therapie definieren lassen.

Beispiel 3: Transfektion von Huh-7 Zellen mit HCV-Genomkonstrukten

30 [0074] Huh-7 Zellen werden wie in Beispiel 2 beschrieben transfiziert und selektioniert, wobei hier jedoch selektionsierbare Konstrukte verwendet werden, die das vollständige Virusgenom enthalten. Die erhaltenen Zellklone werden analog dem Beispiel 2 mittels PCR auf Abwesenheit von HCV-DNA untersucht und die produktive Replikation der HCV-RNA wird danach mittels Northern Blot, [³H]Uridinmarkierung in Anwesenheit von Dactinomycin, Nachweis der viralen 35 Proteine bzw. Antigene vorzugsweise mit Hilfe des Western Blots, der Immunopräzipitation oder der Immunofluoreszenz nachgewiesen. Im Gegensatz zu den im Beispiel 2 beschriebenen Ansätzen lassen sich mit dem hier beschriebenen Konstrukt außerdem vollständige und sehr wahrscheinlich infektiöse Viren erhalten, was bei den dort (in Beispiel 2) beschriebenen Subgenomkonstrukten nicht der Fall ist. Diese Viren, die in der Zelle und dem Zellkulturüberstand vorhanden sind, werden beispielsweise mittels Ultrazentrifugation, Immunopräzipitation oder Fällung mit Polyethylenglykol 40 konzentriert und alle exogenen, d.h. nicht im Viruspartikel eingebauten Nukleinsäuren werden mittels Inkubation mit Nukleaseen (RNase, DNase, Mikrococcusnuklease) verdaut. Auf diese Weise lassen sich alle kontaminierenden Nukleinsäuren, die nicht im schützenden Viruspartikel enthalten sind, entfernen. Die geschützte virale RNA wird nach Inaktivierung der Nukleaseen, beispielsweise mittels Inkubation mit Proteinase K in einem SDS-haltigen Puffer durch Extraktion mit Phenol und Phenol/Chloroform isoliert und mittels Northern Blot oder RT-PCR unter Verwendung HCV-45 spezifischer Primer nachgewiesen. Auch in diesem Versuchsansatz ist die Kombination des beschriebenen HCV-Konsensusgenoms mit einem Selektionsmarker entscheidend für die effiziente Produktion von viraler RNA, viralem Protein und damit von HCV-Partikeln.

Beispiel 4: Herstellung und Anwendung eines HCV-RNA Konstrukt, bei dem das Resistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-Subgenom-Sequenz verbunden ist.

50 [0075] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß Beispiel 1 oder Beispiel 3 hergestellt, bei dem ein Antibiotikumresistenzgen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA-Sequenz verbunden ist. Solche Konstrukte sind in Fig. 7 schematisch dargestellt. Huh-7 Zellen werden wie in Beispiel 2 beschrieben mit diesem 55 HCV-RNA-Konstrukt transfiziert. Nach der Transfektion in die Zellen erfolgt zunächst die Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum. In den dabei erhaltenen Zellklonen wird das einklonierte Ribozym aktiviert oder, im Fall eines Konstrukts, das eine Erkennungsstelle für ein Ribozym trägt, wird das Ribozym in die Zelle eingeschleust (z.B. mittels Transfektion eines Ribozymkonstrucks oder Infektion mit einem viralen Expressionsvektor, in den das entsprechende

Ribozym eingesetzt wurde). In beiden Fällen wird durch die ribozymvermittelte Spaltung das Resistenzgen von der HCV-RNA-Sequenz abgetrennt. Das Ergebnis ist im Fall des HCV-Genom-Konstrukts ein authentisches HCV-Genom ohne Resistenzgen, das zur Bildung authentischer infektiöser Viruspartikel befähigt ist. Im Fall des HCV-Subgenom-Konstrukts entsteht ein HCV-Replikon ohne Resistenzgen.

5

Beispiel 5: Kotransfektion eines HCV-RNA-Konstrukts mit einem separaten Luziferase-Transfektionskonstrukt

[0076] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß Beispiel 1 (A) oder Beispiel 3 oder Beispiel 4 hergestellt. Parallel dazu wird ein Transfektionskonstrukt hergestellt, welches das Luziferasegen umfaßt, wobei dieses Luziferasegen vermittels einer ersten Nukleotidsequenz, die für eine HCV-Protease- (z.B. NS3-Protease-) Spaltungsstelle kodiert, mit einer zweiten Nukleotidsequenz, die für ein anderes Protein oder einen Teil eines anderen Proteins kodiert, verbunden ist. HCV-RNA-Konstrukt und Transfektionskonstrukt werden in beliebige Wirtszellen, vorzugsweise Hepatomazellen, insbesondere Huh-7-Zellen, eingeschleust. Dies kann auf die in Beispiel 2 beschriebene Art und Weise geschehen. Das Produkt des modifizierten Luziferasegens ist ein Luziferase-Fusionsprotein, in dem die Luziferase auf Grund der Fusion mit dem Fremdanteil inaktiv ist. In transfizierten Zellen mit hoher HCV-Replikation wird das Fusionsprotein, das ja eine Schnittstelle für eine HCV-Protease enthält, gespalten und damit die aktive Form der Luziferase freigesetzt, die sich durch luminometrische Messung bestimmen läßt. Wird die Replikation des HCV-RNA-Konstrukts gehemmt, wird das Fusionsprotein nicht gespalten und keine aktive Luziferase freigesetzt. Infolgedessen ist die quantitative Bestimmung der Luziferase ein Maß für die Replikation des HCV-Subgenom-Konstrukts. Anstelle des Luziferasegens kann ebensogut ein anderes Reportergen verwendet werden, das in analoger Weise modifiziert ist, so daß seine Expression von der Virusreplikation abhängt, obwohl dieses Reportergen nicht Bestandteil des HCV-Subgenom-Konstrukts ist. Es kann auch ein zelluläres Protein, welches durch die HCV-Proteine oder Nukleinsäure inaktiviert oder aktiviert wird, als sogenannter Surrogatmarker verwendet werden. In diesem Fall ist die Expression bzw. Aktivität dieses Surrogatmarkers ein Maß für die Replikation der viralen DNA.

25

Beispiel 6: Herstellung von HCV-Subgenom-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen zur Verwendung als leberzellspezifische Genfären für die Gentherapie

[0077] Diese rekombinanten und selektionierbaren HCV-Subgenom-Konstrukte werden in trans-komplementierende Helferzelllinien transfiziert, d.h. in Zelllinien, die induzierbar oder konstitutiv die fehlenden Funktionen (beispielsweise die Strukturproteine) exprimieren. Zellklone, die ein funktionelles HCV-Subgenom-Konstrukt enthalten, lassen sich durch entsprechende Selektion etablieren. Die von der Wirtszelle exprimierten Virus-Strukturproteine erlauben die Bildung von Viruspartikeln, in die die RNA der HCV-Subgenom-Konstrukte eingeschleust wird. Das Ergebnis sind also virus-ähnliche Partikel, die ein erfindungsgemäßes HCV-Subgenom-Konstrukt einschließlich des einklonierten Fremdgens enthalten und die dieses mittels Infektion auf andere Zellen übertragen können. Ein Beispiel für ein solches Konstrukt ist in Fig. 8 dargestellt. Es besteht auch die Möglichkeit, das hier beschriebene erfindungsgemäßes HCV-Subgenom-Konstrukt mit integriertem Fremdgen direkt als Expressionsvektor einzusetzen. Dabei wird analog dem vorgenannten Verfahren vorgegangen, allerdings mit dem Unterschied, daß Zelllinien transfiziert werden, die keine trans-komplementierenden Faktoren exprimieren. In diesem Fall dient das HCV-Konstrukt also lediglich als Expressionsvektor.

Beispiel 7: Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Konstrukte

(A) Isolationsverfahren

45

[0078] Für die Bestimmung adaptiver Mutationen und die Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Konstrukte wurde wie folgt verfahren: Zellen wurden mit einem HCV-RNA-Konstrukt wie unter den Beispielen 1 und 2 beschrieben transfiziert und G418-resistente Zellklone hergestellt. Zur Bestimmung der Replikationskompetenz (darunter wird in diesem Zusammenhang die Anzahl G418-resistenter Zellklone verstanden, die pro Mikrogramm transfizierter HCV-RNA bzw. HCV-RNA-Konstrukt erhalten wird) wurde exemplarisch die Gesamt-RNA aus einem der Zellklone, genannt 9-13 (Fig. 1B, Spur 11) isoliert und die Menge der darin enthaltenen HCV-RNA mittels Northern-blot wie in Fig. 2 B beschrieben bestimmt. 10 Mikrogramm der Gesamt-RNA, die ca. 10^9 Moleküle HCV-RNA enthielt, wurde anschließend per Elektroporation in naive Huh-7 Zellen eingeschleust (Fig. 9). Parallel dazu wurden 10^9 in vitro Transkripte der analogen neo-HCV-RNA, die mit isolierter Gesamt-RNA aus naiven Huh-7 Zellen auf eine Gesamt-RNA-Menge von 10 µg aufgefüllt worden war, in naive Huh-7 Zellen transfiziert. Nach Selektion mit G418 wurde die Anzahl der Zellkolonien, ausgedrückt in 'colony forming units (cfu) pro Mikrogramm RNA' in den beiden Ansätzen bestimmt. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml G418 im Selektionsmedium betrug die Zahl der Kolonien, die mit der in der **Isolierten** Gesamt-RNA enthaltenen HCV-RNA erhalten wurde, ca. 100.000 cfu pro Mikrogramm HCV-RNA. Dagegen wurden mit dersel-

ben Menge in vitro transkribierter HCV-RNA nur 30 - 50 Kolonien erhalten. Dieses Ergebnis belegt, daß die spezifische Infektiosität der HCV-RNA, die aus den Zellklonen isoliert wurde, ca. 1.000 - 10.000-fach höher ist als die Infektiosität der analogen in vitro Transkripte. Das methodische Vorgehen ist in Fig. 9 dargestellt.

[0079] Mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' wurde die HCV-RNA aus der Gesamt-RNA der 9-13 Zellen amplifiziert, die PCR-Amplifikate kloniert und zahlreiche Klone sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen dieser rekliierten RNAs mit der Sequenz der RNA, die ursprünglich in die naiven Huh-7 Zellen eingeschleust wurde ergab, daß die reklierten RNAs zahlreiche Aminosäureaustausche besaßen, die über die gesamte HCV-Sequenz verteilt waren (Fig. 10). *Sfil*-Fragmente dieser rekliierten Mutanten wurden im Austausch gegen das analoge *Sfil*-Fragment des ursprünglichen Replikationskonstrukt in dieses eingeführt und RNAs der jeweiligen Mutanten wurden in naïve Huh-7 Zellen eingeschleust. Nach Selektion mit G418 wurde dann für jede HCV-RNA-Mutante die Zahl der gebildeten Kolonien bestimmt. Während mit der Ausgangs-RNA nur 30 - 50 Kolonien pro Mikrogramm RNA erhalten wurde war die Koloniezahl bei zwei der reklierten Varianten deutlich höher (Fig. 10). Im Fall der HCV-RNA-Konstrukte 9-13I und 9-13C betrug die spezifische Infektiosität 100 - 1.000 cfu pro Mikrogramm RNA und beim 9-13F Replikat sogar 1.000 - 10.000 cfu pro Mikrogramm RNA. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aminosäureaustausche in dem analysierten NS3-5B-Bereich der Mutanten 9-13I, 9-13C und insbesondere 9-13F zu einer deutlichen Erhöhung der Replikationskompetenz führten. Demgegenüber waren alle anderen HCV-RNA-Konstrukte (9-13 A, B, G, H und K) nicht mehr replikationskompetent, enthielten also letale Mutationen.

[0080] Zwecks Beantwortung der Frage, welche der Aminosäureaustausche im 9-13F-Konstrukt zur Steigerung der Replikation führten, wurden die Austausche einzeln oder in Kombination in das Ausgangs-HCV-RNA-Konstrukt eingeführt und die entsprechenden RNAs in naïve Huh-7 Zellen eingeschleust. Das Ergebnis der Transfektionen mit diesen RNAs ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Daraus wird ersichtlich, daß im vorliegenden Beispiel die hohe Replikationskompetenz durch mehrere Mutationen bedingt ist. Den größten Beitrag leisten die Aminosäureaustausche in den HCV-RNA-Abschnitten NS5A und NS4B. Auch die einzelnen Austausche in der NS3-Region leisten einen Beitrag, der möglicherweise auf einem Synergismus dieser Einzelaustausche beruht.

Diese Befunde belegen, daß es durch die G418-Selektion der Zellen, die mit den *neo*-HCV-RNA-Konstrukten transfiziert wurden, zur Anreicherung solcher HCV-RNAs kam, die eine deutlich höhere Replikationskompetenz hatten. Mit dem hier beschriebenen Versuchsanstalt lassen sich HCV-RNA-Konstrukte mit sehr unterschiedlicher Replikationseffizienz selektieren. Je höher die Konzentration des Antibiotikums in dem Selektionsmedium ist, in/auf dem die HCV-RNA-Konstrukt-haltigen Zellen zwecks Selektion kultiviert werden, desto höher muß der Grad an adaptiven Mutationen und damit die Replikationseffizienz in den betreffenden HCV-RNA-Konstrukten sein, damit die Zellen auswachsen können. Werden die Selektions mit niedrigeren Antibiotikum-Konzentrationen durchgeführt, können auch solche Zellen überleben und sich vermehren, die im Vergleich geringer adaptive Mutationen und eine weniger hohe Replikationseffizienz aufweisen.

Das bisher beschriebene HCV-RNA-Konstrukt 9-13F, das mehrere adaptive Mutationen enthielt, hatte eine erwiesenermaßen höhere Replikationseffizienz als die parentale HCV-RNA. Um HCV-RNAs mit noch höherer Replikation in Zellkultur zu erhalten, wurde die HCV-RNA, die in der Gesamt-RNA eines ausgewählten Zellklons enthalten war, mehrfach in naïven Huh-7 Zellen passagiert. Dieser ausgewählte Zellklon, genannt 5-15, wurde durch Transfektion mit dem HCV-RNA-Konstrukt I₃₈₉/NS3-3' erhalten (Fig. 1). Er entspricht weitgehend dem Zellklon 9-13, der durch Transfektion mit einem HCV-RNA-Konstrukt hergestellt wurde, das eine um 22 Nukleotide kürzere HCV-IRES besaß (I₃₇₇/NS3-3'; Fig. 1). 10 Mikrogramm Gesamt-RNA, isoliert aus dem Zellklon 5-15, wurden mittels Elektroporation in naïve Huh-7 Zellen eingeschleust und die Zellen einer Selektion mit 1 mg/ml G418 unterzogen. Aus einem der so erzeugten Zellklone wurde wiederum Gesamt-RNA isoliert, in naïve Huh-7 Zellen transfiziert und analog selektiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Nach der vierten Passage wurde aus einem Zellklon die Gesamt-RNA isoliert und die *neo*-HCV-RNA mit Hilfe der 'long-distance RT-PCR' amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *Sfil* verdaut und in das *Sfil*-restringierte Ausgangskonstrukt I₃₈₉/NS3-3' inseriert. Insgesamt wurden über 100 DNA-Klone erhalten und zunächst mittels Restriktionsverdau analysiert. In vitro transkribierte RNA von ca. 80 dieser Klone wurde jeweils in naïve Huh-7 eingeschleust und einer Selektion mit 500mg/ml G418 unterzogen. Von den 80 untersuchten *neo*-HCV-RNA-Varianten erwiesen sich die allermeisten als replikationsdefekt. Bei zwei Mutanten, genannt 5.1 und 19, war die spezifische Infektiosität, ausgedrückt als 'colony forming units' pro Mikrogramm RNA, jedoch sehr deutlich erhöht (Tabelle 2). Durch mehrfache Passage der RNA in Zellkultur lassen sich offensichtlich HCV-RNAs herstellen, deren Replikationseffizienz aufgrund von Mutationen (sog. "adaptiven Mutationen") mehrere Größenordnungen höher ist als die der ursprünglich aus dem Patienten klonierten RNA.

(B) Modifikationsverfahren

[0081] Solche nach (A) erzeugten und identifizierten adaptiven Mutationen können in ein wenig replikationskompetentes HCV-RNA-Konstrukt übertragen werden und führen zu einer massiven Steigerung der Replikation dieses Konstrukt. Diese Steigerung ist so hoch, daß damit nachweislich HCV-RNAs in Zellkultur zur Replikation gebracht

werden können, die kein selektierbares Markergen mehr besitzen. Fig. 12 zeigt einen Vergleich der Replikationseffizienz von HCV-RNAs, die entweder der Ausgangssequenz oder den adaptierten Sequenzen 9-13F bzw. 5.1 entsprachen. Zwecks einfacher Messung wurde das *neo*-Gen entfernt und durch das Gen für die Luziferase ersetzt. Als Negativkontrolle diente wiederum ein HCV-RNA-Konstrukt, das auf Grund einer inaktivierenden Mutation der NS5B RNA-Polymerase replikationsdefekt war. Schon 24 Stunden nach der Transfektion erkennt man einen deutlichen Unterschied in der Luziferaseaktivität zwischen der defekten RNA und den 9-13F bzw. 5.1-Konstrukten während zwischen der defekten RNA (318 DN) und dem Ausgangs-RNA-Konstrukt (wt) das keine adaptiven Mutationen besaß, kaum ein Unterschied zu sehen war. Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurde die höchste Luziferaseaktivität und damit die höchste Replikation mit der 5.1-RNA erhalten. Diese Befunde belegen nicht nur die hohe Replikationseffizienz dieser RNA, sondern zeigen auch, daß es möglich ist, mit adaptierten HCV-RNA-Konstrukten ein Zellkultursystem aufzubauen, für das die Anwesenheit eines selektierbaren Gens nicht mehr notwendig ist. Eine zusammenfassende Übersicht der Nukleotid- und Aminosäureunterschiede zwischen dem Ausgangskonstrukt und den Mutanten 9-13F, 5.1 und 19 ist in Tabelle 3 gegeben.

15 Beispiel 8: Herstellung zellkultur-adaptierter HCV-RNA-Vollängengenome

[0082] In den Beispielen 1 bis 7 wurde stets eine subgenomische HCV-RNA verwendet, die die gesamte Strukturproteinregion von Core bis einschließlich p7 bzw. NS2 fehlte. Im vorliegenden Beispiel 8 wird gezeigt, daß es möglich ist, mit Hilfe der adaptierten NS3-5B-Sequenz ein HCV-Vollängengenom in Zellkultur zur Replikation zu bringen. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Sfl-Fragment der gemäß Beispiel 7 hergestellten, hoch adaptierten HCV-RNA 5.1 in ein selektionierbares HCV-Vollängengenom transferiert (Fig. 12). Dieses HCV-Genom wurde in naïve Huh-7 Zellen transfiziert und einer Selektion mit unterschiedlichen G418-Konzentrationen unterzogen. In Abhängigkeit von der Selektionsstärke (der G418-Konzentration) wurde eine unterschiedlich große Zahl an Zellklonen erhalten (Fig. 12 B). Im Vergleich dazu wurden mit dem unveränderten HCV-Vollängengenom, das keine-adaptiven Mutationen enthielt, keine Kolonien erhalten, ebenso mit der Negativkontrolle, die auf Grund einer inaktivierenden Mutation in der NS5B RNA-Polymerase replikationsdefekt war. Zum Nachweis dafür, daß die so entstandenen Zellklone tatsächlich ein autonom replizierendes HCV-Vollängengenkonstrukt enthielten, wurde Gesamt-RNA aus mehreren Zellklonen isoliert und mittels Northern-Blot analysiert. In allen Zellklonen war die Vollänge HCV-RNA eindeutig nachweisbar (Fig. 12). Damit ist eindeutig belegt, daß es mit Hilfe der an Zellkulturen adaptierten HCV-Sequenzen möglich ist, ein HCV-Vollängengenom herzustellen, das mit hoher Effizienz und autonom in einer Zelllinie repliziert, d.h. es können mit dem erfundungsgemäß System auch adaptierte HCV-Vollängengenome hergestellt werden. Da dieser Klon darüber hinaus die vollständige HCV-Sequenz besitzt, also auch die für die Viruspartikelbildung notwendigen Strukturproteine, ist es mit diesem System möglich, große Mengen infektiöser Viruspartikel in Zellkulturen herzustellen. Zum Nachweis dieser Viren werden zellfreie Überstände von Zellen, die ein replizierendes HCV-Vollängengenom tragen, auf naive Huh-7 Zellen gegeben und die so infizierten Zellen einer Selektion mit G418 unterzogen. Jeder Zellklon, der unter diesen Bedingungen auswächst, geht auf eine infizierte Zelle zurück. Die Viren in den Zellkulturüberständen von Zellen, die ein replizierendes HCV-Vollängengenom besitzen, können aber auch mit verschiedenen im Stand der Technik bekannten Verfahren wie Ultrazentrifugation oder Mikrodialyse angereichert und gereinigt werden und dann zur Infektion naiver Zellen verwendet werden. Mit diesem Verfahren ist eindeutig gezeigt, daß mit dem erfundungsgemäß HCV-Zellkultursystem zellkultur-adaptierte HCV-Vollängengenome hergestellt werden können, die mit hoher Effizienz in Zellen replizieren und infektiöse Viren produzieren. Diese können ebenfalls durch Infektion eines Versuchstiers, vorzugsweise dem Schimpansen, nachgewiesen werden.

Beispiel 9: Herstellung von HCV-Vollängen-Konstrukten und HCV-Subgenom-Konstrukten mit Reportergen.

[0083] Es wird ein HCV-RNA-Konstrukt hergestellt, bei dem anstelle des Antibiotikumresistenzgens ein Reportergen eingefügt wird (Fig. 13). Dabei kann die Replikation anhand der Menge bzw. der Aktivität des Reportergens bzw. Reportergenprodukts bestimmt werden. Das Reportergen ist vorzugsweise ein Gen aus der Gruppe der Luziferasegene, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasegen), dem GFP-Gen (green fluorescence protein Gen), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) oder dem SEAP-Gen (sezernierte alkalische Phosphatasegen). Diese Reportergene bzw. deren Produkte, nämlich die entsprechenden Reporterproteine, können z.B. mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, colorimetrisch oder mit Hilfe immunologischer Methoden (z.B. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) bestimmt werden. Das Reportergen kann entweder von einer eigenen IRES exprimiert werden oder in Form eines Fusionsproteins, das entweder als solches aktiv ist oder mittels einer proteolytisch spaltbaren Aminosäuresequenz so mit einem HCV-Protein verbunden ist, daß es von einer zellulären oder viralen (HCV-)Protease von diesem abgespalten wird.

Beispiel 10: Herstellung von HCV-Vollängen-Konstrukten mit integrierten Fremdgenen zur Verwendung als leberzellspezifische Genfähre für die Gentherapie oder als Expressionsvektor.

[0084] Das Konstrukt (Fig. 14) wird in Zellen eingeschleust und führt dort zur Bildung von HCV-Viruspartikeln, die 5 zur Infektion weiterer Zellen verwendet werden können. Da die Viruspartikel eine RNA mit einem Fremdgen enkapsuliert haben kann dieses in den so infizierten Zellen zur Produktion des von diesem Fremdgen kodierten Proteins benutzt werden. Zellen, die mit dem Konstrukt transfiziert wurden, exprimieren ebenfalls das Fremdgen.

Beispiel 11: Herstellung von monocistroneischen HCV-RNA-Konstrukten, bei denen das Resistenzgenprodukt 10 als Fusionsprotein mit dem HCV-Anteil exprimiert wird.

[0085] Für bestimmte Untersuchungen ist es von Vorteil, wenn das HCV-RNA-Konstrukt kein heterologes IRES-Element besitzt. Solche Untersuchungen sind beispielsweise die Bestimmung der Interferonresistenz. Wird eine Zelle, die 15 ein HCV-RNA-Konstrukt besitzt, mit Interferon-alpha oder -beta inkubiert, kommt es zu einer Reduktion der Replikation der HCV-RNA. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus ist es notwendig, daß das HCV-RNA-Konstrukt keine heterologe IRES besitzt, da ansonsten nicht bestimmt werden kann, ob die Interferon-vermittelte Hemmung durch eine Hemmung der HCV-Replikation oder durch eine Hemmung der heterologen IRES vermittelt wird. Deshalb werden Konstrukte hergestellt, bei denen das Resistenzgen mit einem HCV-Protein fusioniert wird (Fig. 15). Entweder das Fusionsprotein ist als solches aktiv oder das Resistenzgenprodukt wird mittels einer proteolytisch spaltbaren 20 Aminosäuresequenz so mit einem HCV-Protein verbunden ist, daß es von einer zellulären oder viralen (HCV-)Protease von diesem abgespalten wird.

Tabelle 1

Spezifische Infektiositäten (cfu/µg RNA) der HCV-RNA-Konstrukte mit adaptiven Mutationen, die bei der 9-13F Mutante gefunden und in das parentale HCV-RNA-Konstrukt I ₃₈₉ /NS3-3'/wt eingeführt wurden		
Aminosäureaustausch ¹	HCV-Protein	cfu/µg RNA ²
kein		30 - 60
1283 arg -> gly	NS3	200 - 250
1383 glu -> ala	NS3	30 - 60
1577 lys -> arg	NS3	30 - 60
1609 lys -> glu	NS3	160 - 300
(1283 arg -> gly + 1383 glu -> ala + 1577 lys -> arg + 1609 lys -> glu)	NS3	360 - 420
1936 pro -> ser	NS4B	500 - 1000
2163 glu -> gly	NS5A	1000-5000
2330 lys -> glu	NS5A	30 - 60
2442 ile -> val	NS5B	30 - 60
alle zusammen		5000

¹ Aminosäureaustausch im Polyprotein des HCV-Isolats Con-1 (EMBL-Genbank No. AJ238799); die Aminosäuren sind im Dreibuchstabenkode angegeben.

² Colony forming units (Anzahl der Zellklone) bei einer Selektion von 500µg/ml G418.

EP 1 043 399 A2

Tabelle 2

Spezifische Infektiositäten (cfu/ μ g RNA) des parentalen HCV-RNA-Konstrukts I ₃₈₉ /NS3-3'/wt und der Varianten 9-13C, 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19.		
Transfizierte ante	RNA-Vari- ante	cfu/ μ g RNA ¹
	Wildtyp	30 - 50
	9-13 C	100 - 1.000
	9-13 I	100 - 1.000
	9-13 F	1.000 - 10.000
	5.1	50.000 - 100.000
	19	50.000 - 100.000

¹ Colony forming units (Anzahl der Zellklone) bei einer Selektion von 500 μ g/ml G418.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5 Tabelle 3: Nukleotid- und Aminosäureunterschiede zwischen dem parentalen HCV-
 RNA-Konstrukt I₃₈₉/NS3-3'/wt und den Mutanten 9-13I, 9-13F, 5.1 und 19

HCV Mutante	Nukleotidposition	Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch
9-13 I	3685	C > T	Pro > Leu
	4933	C > T	Thr > Met
	5249	T > C	-
	8486	C > T	-
	8821	G > A	Trp > stop
	8991	C > G	Arg > Gly
	9203	A > G	-
	9313	T > C	Phe > Ser
	9346	T > C	Val > Ala
	9-13 F	C > T	-
9-13 F	3866	A > G	Arg > Gly
	4188	A > C	Glu > Ala
	4489	G > A	-
	4562	T > C	-
	4983	A > G	Lys > Arg
	5071	A > G	Lys > Glu
	5166	C > T	Pro > Ser
	6147	A > G	Glu > Gly
	6829	A > G	Lys > Glu
	7329	A > G	Ile > Val
NK5.1	7664	C > T	-
	8486	C > G	Arg > Gly
	8991	C > T	Thr > Ile
	4180	C > T	-
	4679	C > T	-

	4682	T > C	-
5	5610	C > A	Leu > Ile
	6437	A > G	-
10	6666	A > G	Asn > Asp
	6842	C > T	-
	6926	C > T	-
15	6930	T > C	Ser > Pro
	7320	C > T	Pro > Ser
	7389	A > G	Lys > Glu
20	NK19	A > G	Glu > Gly
	4078	C > G	Ala > Gly
	4180	C > T	Thr > Ile
25	4682	T > C	-
	5610	C > A	Leu > Ile
30	5958	A > T	Met > Leu
	6170	T > A	-
	6596	G > A	-
35	6598	C > G	Ala > Gly
	6833	C > T	-
	6842	C > T	-
40	6930	T > C	Ser > Pro
	7141	A > G	Glu > Gly
	7320	C > T	Pro > Ser
45	7389	A > G	Lys > Glu
	7735	G > A	Ser > Asn

50

[0086] Angegeben sind die Unterschiede der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zwischen der Ausgangs-HCV-RNA-Sequenz Con 1 (EMBL-Genbank No. AJ238799) und denen der zellkulturadaptierten HCV-RNAs. Die Zahlen beziehen sich auf die Nukleotid- und Aminosäurepositionen des HCV-Isolats Con1.

EP 1 043 399 A2

SEQUENCE LISTING

5 <110> Bartenschlager, Ralf
 10 <120> Hepatitis C Virus cell culture system
 15 <130> ba-1
 20 <140> 199 15 178.4
 25 <141> 1999-04-03
 30 <160> 11
 35 <170> PatentIn Ver. 2.1
 40 <210> 1
 45 <211> 11076
 50 <212> DNA
 55 <213> Hepatitis C Virus
 60 <400> 1
 gccagcccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
 ccccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaaccgg 180
 gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccccg ctcaatgcct ggagatggg ggcgtgc 240
 gcgagactgc tagccggatc gtgtgggtc gggaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 300
 gtgttgcga gtggcccccggg aggtctcgat gaccgtgcac catgagcagc aatcttaaac 360
 ctcaaaagaas aaccaaaacgt aacaccaacg ggcgcgcatt gattgaacaa gatggattgc 420
 acgcaggatc tccggccgtc tggggggaga ggatattcg 480
 caatcggtcg tctgtatgcc ggcgtgttcc ggctgtcagc gcaaggccgc cgggttctt 540
 ttgtcaagac cgacactgtcc ggtgcctga atgaaactgc 600
 cgtggctggc cacgacgggc ttteccctgcg cagctgtgtc 660
 gaaggggactg getgtatgg gggaaagtgc eggggcaggaa tcteetgtca tetcacettg 720
 ctccctgcga gaaagtatccc atcatggctg atgcaatgc 780
 cggcacccatcg cccatcgac caccaagcga aacatcgat 840
 tggaaaggcccg tcttgcgtatc caggatgtc tggacgaga 900
 ccgaactgtt cggcagggtc aaggcgcga 960
 atggcgatgc ctgttgcgc aatatacatgg tggaaatagg 1020
 actgtggccg gctgggtgtc ggggaccgc 1080
 ttgtgttgcgatc gcttggccgc gaatgggtcg accgttctt 1140
 ctccctgcgtc cgacgcgtatc gccttctatc 1200
 cagaccacaa cgggttccctt ctatggggat caattccgc 1260
 aacgttactg gccgaaggcg ctggaaataa ggccgggtgt 1320
 tccacccatatc tgccgttgc tggcaatgtc aggccccgg 1380
 acgagccatc cttaggggtct ttcccccttc 1440
 gtgaaggaag cagttccctt ggaagcttct tgaagacaaa 1500
 tgcaggcgc ggaacccccc acctggcgcac aggtgcctct 1560
 taagatatacc ctgcaaaaggc ggcacaaacc 1620
 gaaagagtca aatggcttc ctcaacgcgtt 1680
 gtaccccatgt gtatggatc tgatctgggg cctcggtca 1740
 tcgaggatcaa aaaaactcta ggccccccgg 1800
 cacaatataa ccatgggcac gaatcttcaa 1860
 cgccgcaccac aggacgtcaatc gttccgggc 1920
 ttgcgcgcga gggggccccc 1980
 caacccctgtg gaaggcgcaca acctatcccc 2040
 gtcagcccg gttacccctt gccccctat 2100
 ctccctgttcac cccgtggcc tcggcctagt 2160
 cgcaattttgg gtaagggtcat cgataaccctc 2220
 attccgtctcg tccggcccccc ccttaggggc 2280
 gtcttggagg acggcgtgaa ctatgcataa 2340
 ttccctttgg ctgttgcgtc ctgttgcgtt 2400
 gtatccggag tgttacatgt caegaaacgc 2460
 gccggacatga tcatgcatac ccccggtgc 2520
 cgctgtctggg tagegtctac tccatgcatac 2580
 acgatcgcac gccatgcata 2640
 gtggggatc tctgcggatc tgggttctc 2700

EP 1 043 399 A2

5	cggtacggata cagttacaggaa ctgcaattgc tcaatatac cccggccacgt gacaggtaac 2760 cgatggctt gggatatgtat gatgaactgg tcacctacag cagccctagt ggtatcgac 2820 ttactccggaa tccccacaacg tgtcggat atgtggccg gggccctatc gggaggctca 2880 ggggcccttg ccttatttc catggggggg aactgggtt aggttctgtat tggatgtatc 2940 ctcttggcg cggttacggg gggaaacctat gtgacagggg ggacatggc caaaaacacc 3000
10	ctcgggatta cggttccctt ttccccggg tcatcccaga aaatccagct tgtaaacacc 3060 aacggcagctt ggcacatca caggactgc ctgaaactgc atgactccctt caacactggg 3120 ttccttgcgt cgctttca cgtgcacaaat tcaactcat ctggatgccc agagcgtatc 3180 ggccagctca gccccatca cgcgttcgtc cagggggtgg ggeccatcac ttacaatgag 3240 tcacacagct cggaccagag gccttattgt tggcaactacg caccggggcc gtgcggatc 3300
15	gtacccgggg cgccagggttgg tggtcacggg tactgttca ccccaagccc tgctgtgtg 3360 gggacgaccg accgggttgg cgcccttacg taeagttggg gggagaatga gacggacgtg 3420 ctgttcttca acaacacggc gecgcgcgaas ggecaactgtt tggtctgtac atggatgtat 3480 agcaactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccccgtta acatcggggg gatcgcaat 3540 aaaaccttga cctggcccaat ggactgttcc eggaaagcacc cggaggccac ttacaceaag 3600 tgtggttcgg ggccttggg gacacccaga tggttgtcc actatccata caggcttgg 3660 cacttccctt gcaactgttca ctttaccatc ttcacagggtt tgatgtacgt gggggggatgt 3720 gagcacaggc tcgaagccgc atgcaattgg actcgaggag agcggtttaa cctggagggac 3780 agggagcacatc cagagcttag cccgcgtgtc ctgtctcaaa cggagtggca ggtatggcc 3840 tggcccttca ccacccatcc ggetctgtcc actgggttga tccatcttca tcagaacgtc 3900 gtggacgtac aatactgttca cggatgttggg ttcgttgggtc aatacaatgtt 3960 gagttatgtcc tggatgttcc ctttcttctg gggacgccc gggctgtgtc ctgtttgtgg 4020 atgtatgttc tgatagttca agctggggcc gcccstagaga acctgtgtgtt cctcaacccg 4080 gcatccgggg ccggggggca tggcatttcc tcccttctgt tggttcttgc tgctgttgc 4140 tacatcaaggc cgaggctgtt ccctggggcc gcatatggcc ttcacgggtt atggccgtt 4200 cttctgttcc tggatgttggg accaccacgg gcatacgcca tggaccggga gatggcagca 4260 tcgttccggag gcgccgggtt ctaggttctg atactcttga ctttgcattcc gcaactataag 4320 ctgttccctc ctaggtctat atgggttta caatattttt tccacagggtt cgaggccac 4380 ttgcacatgtt ggatcccccc cctcaacatgtt cggggggggcc gcatatgttcc tccatcttgc 4440 acgttgcgtca tccacccaga gctaattttt accatcacca aatacttgcg tggccatactc 4500 gttccactca tggatgttca ggctgttata accaaaatgtc ctgtactatgtt ggcgcacac 4560 gggttcatgtt gtycatgttca gctgttggg aaggttctgg ggggttattt tggttcaatgt 4620 gtctctgttca aatgtggccg actgacaggat ctgtatgtt atgaccatctt cacccttactt 4680 cggttccatgtt cccacggggg cctacagagac ctgcgttggg cagttgagcc cgctgttcc 4740 tctgtatgttcc agaccaatgtt tttacccctgg gggggagaca cccgggggtgt tggggatcatc 4800 atcttggggcc tggccgttcc cggccggcgg gggggggggaa tatacttggg accggcagac 4860 agcccttgggg ggcagggttcc gggacttcc ggcgttattt ccccttacttcc ccaacagacg 4920 cgaggccatcc ttggctgtatc catcaacttgc ctcacaggcc gggacaggaa ccaggctcag 4980 ggggggatgttcc aatgtggccg caccgttccatgtt tggcggactt cgttcaatgtt 5040 gtgttccatgtt ctgttccatgtt tggatgttcc tcaagatgtt ttgcggccccc aaaggccca 5100 atcaacccaaa tggatgttca tggatgttcc gacccatgtt ctttgcgttgc gttggcaatc 5160 gcgcgttccatgtt tgacaccatgtt caccgttccatgtt agcttgcggcc ttacttggg caccggat 5220 ggccgtatgttca ttccgggttcc cccggggggcc gacagcaggaa ggaggccatcttcttcttctt 5280 cccggttccatgtt acttgcggggg ctetttccggg ggttcaatgtc tctggcccttc gggggacatgt 5340 gttggccatgtt ttccgggttcc ctgttccatgtt cccggggggcc tggggggccgtt gggacttgc 5400 cccggttccatgtt ctatggaaat cactatgttcc tcccttgcgtt ttcacggatcaatgtt 5460 ccggccgttccatgtt cggcagacatcc cccggggggcc cactacacgg ccccttacttgc tagccggcaag 5520 agcaactaaagg tggccgttccatgtt ctgttccatgtt cccggggggcc tttacttggg ctttgcgttcc 5580 tcccgccatgttcc cccggggggcc gacccatgtt cccggggggcc tttacttggg tttacttggg 5640 aacatcatgttcc cccggggggcc gacccatgtt cccggggggcc tttacttggg tttacttggg 5700 ggcaatgttcc ttccgggttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 5760 gagtcgttccatgtt cccggggggcc gacccatgtt cccggggggcc tttacttggg tttacttggg 5820 gagacggccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 5880 gttccatgttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 5940 ggcaaaatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6000 aagaagaaatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6060 tattttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6120 acggacgttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6180 tgtgttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6240 gttccatgttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6300 ggcattttca ggttttgcgttcc tccggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg 6360 ctgttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6420 gtttaggttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6480 tttttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6540 aaggccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6600 gttccatgttccatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tggatgttcc tttacttggg tttacttggg 6660
50	

EP 1 043 399 A2

gctgccactt gtggcaagta cctttcaac tggcagtaa ggaccaagct caaactcact 10680
ccaatcccggtgcgtccca gttggattta tccagctgg tcgttgcgg ttacagcggg 10740
5 ggagacatat atcacagcct gtctcggtcc cgaccggct ggtcatgtg gtgcctactc 10800
ctactttctgttagggtagg catctatcta ctcccccaacc gatgaacggg gagctaaaca 10860
ctccaggccatccatc ctgtttttttt ccctttttt tttctttttt tttttttttt 10920
ttttttttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 10980
tggctccatcttagccctag tcacggctag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgactgc 11040
agagagtgtctactggcc tctctgcaga tcaagt 11076

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 2
<211> 8637
<212> DNA
<213> Hepatitis C Virus

EP 1 043 399 A2

5	cacccatctt	tctggcattc	caagaagaaa	tgtatgagc	tcgcccgcga	gtgtccccgc	3600
	ctcgactca	atgtgttagc	atattaccgg	ggccttgatg	tatccgtcat	accaaactgc	3660
	ggagacgtc	ttgtcgtag	aacggacgt	ctaatacg	gttttacccg	cgatttgcac	3720
	tcaatgtcg	actgcaatc	atgtgtcac	cagacagtcg	acttccgcct	ggacccgacc	3780
	ttcaccattg	agacgacgac	cgtgcaccaa	gacgcggtgt	cacgctcgca	gccccgaggc	3840
	aggactggta	ggggcaggat	gggcattac	aggtttgtg	ctccaggaga	acggccctcg	3900
	ggcatgttc	atttccctgg	tctgtcgag	tgtatgacg	ogggtctgtg	ttggatcag	3960
	ctcaccccg	ccgagaccc	agttaggtg	cggttacc	taaacacacc	agggttgcac	4020
	gtctgccagg	accatctgg	gttctggag	agcgttta	caggcctcac	ccacatagac	4080
	gccccattct	tgtcccagac	taagcaggca	ggagacaact	ccccctacct	gttagcatac	4140
	caggctacgg	tgtgccecg	ggctcaggct	ccacccat	ctgtggacc	aatgtggaa	4200
	tgtctcatac	ggcttaaaggc	tacgctgcac	gggccaacgc	ccctgtgt	taggtggaa	4260
	gcccgttcaa	acgagggtac	taccacac	ccccataacca	atacatcat	ggcatgcgt	4320
	tccgctgacc	tggagggtcg	cacgagcacc	tgggtgtcg	taggcggagt	cctagcaact	4380
	ctggcccggt	atggctgtac	aacaggcagc	gtgtcatt	ttggcaggat	catcttgc	4440
	gaaaaggccg	ccatattcc	cgacaggaa	gtctttacc	gggagatcga	ttagatgaa	4500
	gagtgcgcct	cacacccccc	tttacatcga	cagggaatgc	agctcgccga	acaattcaaa	4560
	cagaaggcaa	tcgggttgc	gcaaaacagcc	accaagcaag	cgaggagctgc	tgctccctgt	4620
	gtggaaatcc	agtggcggac	cctcgaagcc	ttctgggg	agcatatgtg	gaatttcatc	4680
	agcgggatac	aatatttagc	aggettgc	actctgcct	gcaacccccc	gatagcatac	4740
	ctgtatggat	tcacagccct	tatcaccag	ccgtcacc	ccccacatac	cctctctgtt	4800
	aacatctgg	ggggatgggt	ggccggccaa	cttgcetctc	ccagegetgc	ttctgettc	4860
	gttaggcggc	gcatctgg	agcgggtgtt	ggcagcatag	gttctgggg	gtgttgcgt	4920
	gtatatttgg	cagggtatgg	agcagggtg	cgaggcgc	tctgtggctt	taaggteat	4980
	agcggcggaga	tgccctccac	cgaggac	gttacactc	ccccctgtat	cctctccct	5040
	ggcgccttag	tgtcggtt	cgtgtcgca	gcatactgc	gttggcacgt	ggggccaggg	5100
	gagggggctg	tgcagtgt	gaaccggct	atagcgttc	tttgcgggg	taaccacgtc	5160
	tcccccaccc	actatgtgc	ttagagcgc	gtgcagcac	gttgcactca	gatctcttc	5220
	agtcttacca	tcactca	gctgaagg	cttaccat	gatcaacgc	ggactgtcc	5280
	acggcatgtc	ccggctcg	gctaagagat	gttgggatt	ggatatgcac	gtgttgcact	5340
	gatttcaaga	cctggctcca	gttcaactc	ctggccgc	tttggggat	cccccttttc	5400
	tcatgtcaac	gttggatcca	ggggatctgg	cgggggc	gtatcgca	aaccacgtc	5460
	ccatgtggag	cacagatcc	cgacatgt	aaaaacgg	ccatgaggat	ctgggggtt	5520
	aggacatgt	gtaacacgt	gatggaa	ttccccat	acgcgtacac	cacggggccc	5580
	tgcacccccc	cccccgg	aaattttat	aggcgtgt	gggggggt	tctgtggag	5640
	tacgtgggg	ttacgtgg	gggggat	cactatcg	cgggcatgac	cactgacaa	5700
	gtaaatgtcc	ctgtcgat	tccgggg	gaatttctt	cagaagtgg	tggggtgcgg	5760
	ttgcacagg	acgttccac	gtgcaaa	cttctac	aggaggtc	attctgttc	5820
	gggctcaatc	aatacttgc	tgggtcac	ctccatgc	accccggaa	ggacgtacg	5880
	gtgtctcaat	ccatgtc	cgaccc	cacattac	cgagagacgc	taagctgt	5940
	ctggccagg	gatctccc	tcccttgg	agtcatc	ctagccag	gtctgcgt	6000
	tccttgaagg	caacatgcac	tacccgtat	gactcccc	acgctgac	catcgagcc	6060
	aaccttctgt	ggccggcgg	gatgggggg	aaatcaccc	gcgtggagtc	agaaaaataa	6120
	gttagtaattt	tggactt	cgacccgtc	caacgggg	aggatggag	ggaaatgtac	6180
	gttccggcgg	agatctcg	gagggttcc	aaatttcc	ggcgtatgc	cataatggca	6240
	cgcccccgtt	acaaccc	actgttag	tcctggaa	acccggacta	cttcccttca	6300
	gttggatcac	gggttccat	ggccgtcg	aaaggccctc	cgataccac	tccacgggg	6360
	aagaggacgg	ttgtctgt	agaatata	gtgtttct	cttgggggg	gttgcacca	6420
	aagacatctg	cgacgtcc	atcgtcg	gtcgtac	gcacggca	ggctcttc	6480
	gaccagccct	cgacgac	cgacggg	tccacgtt	agtcgtact	ctccatgtcc	6540
	cccttgcgg	ggggccgg	ggatccat	ctacgc	gttcttgg	tacccgtaa	6600
	gaggaggc	gtgaggac	cgatgtc	tegtgt	acacatgg	aggccctc	6660
	atcacgttat	cgctcg	ggaaaac	ctggccat	atgcact	caacttctt	6720
	ctccgtcacc	acaacttgc	ctatgtac	acatctcg	gegcaagct	ggggcagaag	6780
	aaggcttacc	ttgacat	cgaggctt	gacgacc	acccggac	gttcaagag	6840
	atgaaggc	agggttcc	atgttgc	aaacttct	ccgtgggg	agctgttaa	6900
	ctgacccccc	cacattcg	cagatc	tttgc	ggggcaagg	ctggccgaa	6960
	ctatccagca	aggccgtt	aa	ccatccgc	tccgtgt	aggacttgc	7020
	gagacacccaa	ttgacacc	catatgg	aaaaatgg	ttttctgc	ccaaacagag	7080
	aaggggggcc	gcaaggcc	tcgc	tttccat	gttcc	tttttttt	7140
	gagaaaaatgg	ccctttat	tgtgttcc	accccttcc	agggctgt	gggtcttc	7200
	tacggattcc	aatacttcc	tggac	gtcgat	ttgt	ggatgc	7260
	aagaatgtcc	ctatgg	ccatgtcg	accctgtt	ttgact	caac	7320
	aatgacatcc	gtgttgc	gtcaat	caatgttq	atgtt	gggttttt	7380
	caggccatcc	ggtcgtc	agagccgtt	tatctgggg	cccccttgc	taatttctta	7440
	ggggcagaact	ggccgtatcg	ccgtgtcc	gcaagcgggt	tactgac	cagctgcgg	7500

EP 1 043 399 A2

aataccctca catgttactt gaaggccgct gcggcctgtc gagctgcgaa gctccaggac 7560
tgcacgatgc tcgttatgcgg agacgacattt gtcgttatct gtgaaagcgc ggggacccaa 7620
gaggacgagg cgagcctacg ggccttcacg gaggctatga cttagatactc tgccccccct 7680
5 ggggaccgc ccaaaccaga atacgacttg gagttataa catcatgtc tcccaatgtg 7740
tcagtcgcgc acgatgcac tcacccgtga ccccaccacc 7800
cccccttgcgc gggctgcgtg ggagacagct agacacactc cagtcatttc ctggcttaggc 7860
aacatcatca tttatgcgcc cacccttgtt gcaaggatga tcctgtatgc tcatttcttc 7920
tccatcettc tagctcagga acaacttggaa aaagcccttag attgtcagat ctacggggcc 7980
10 ttgttacttcca ttgagccact tgacctaccc cagatcatcc aacgacttca tggccttagc 8040
gcattttcac tccatagtta ctctccaggt gagatcaata gggtggttcc atgcctcagg 8100
aaacttgggg taccggccctt gggatgttgg agacatcggg ccagaagtgt ccgcgtttagg 8160
ctactgtccc agggggggggag ggctgcccact tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 8220
aggaccaagg tcaaactcac tccaaatcccg gctgcgtccc agttggattt atccagctgg 8280
15 ttcgttgcgtg gttacagcgg gggagacata tatcacagcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 8340
tggttcatgt ggtgcctact cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 8400
cgatgaacgg ggagctaaac actccaggcc aataggccat cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 8460
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 8520
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 8580
gtccgtgagc cgcttgactg cagagagtgc tgatactggc ctctctgtcag atcaagt 8637

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 043 399 A2

EP 1 043 399 A2

cgggccagaa gtgtccgcgc taggctactg tcccaggggg ggagggctgc cacttgtggc 7560
aagtacctct tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcactccaat cccggctgcg 7620
5 tcccagttgg atttattccag ctggttcggt gctggttaca gcgggggaga catatatcac 7680
agcctgtctc gtgcccggacc ccgctggttc atgtggtgcc tactcctact ttctgttaggg 7740
gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
ccatcctgtt ttttccctt ttttttttc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
ttttctcctt ttttttcctt cttttttcc ttttcttcc ttgggtggct ccatcttagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
10 tggcctctct gcagatcaag t 8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 4
 <211> 7989
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5
 <400> 4
 gccagcccc gattggggc gacactccac catagatcac tccccgtgta ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaaggctt agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
 ccccccctcc gggagagcca tagtggtctg cggAACCGGT gagtacacccg gaattgccag 180
 10 gacgaccggg tcctttctt gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtaact gcctgtatagg 300
 gtgttgtcga gtggccccc agggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatccaaac 360
 ctccaaagaaa aaccaaaggg cggccatgta ttgaaacaaga tggattgcac gcaggttctc 420
 15 cgcccgctt ggtggagagg ctatccggct atgactgggc acsacagaca atcggtgtct 480
 ctgatgecgc cgtgtccgg ctgtcagegc aggggcgcgc ggttctttt gtcagaccc 540
 acctgtccgg tgccctgtaa gaaatgcagg accggggcgc gcggctatcg tggctggca 600
 20 cgacgggctg tccctgcga gctgtgtcg acgtgttcac tgaagcggga agggactggc 660
 tgctattttt cgaagtgcgc gggcaggatc tccgtcata tcacccgtct cctggcaga 720
 aagtatccat catggctgtat gcaatgcgc ggctgcatac gtttgatccg getacactgc 780
 cattcgacca ccaaggaaaa catccgcattcg acgcggacgc tactccgtatg gaagccggc 840
 ttgtcgatca ggatgtatcg gaeaaagagc atcgatgggtt cggccggcc gaaatgttcg 900
 ccaggctca ggcgcgcatt cccgacggcg aggatctcg tggccatcat ggcgtatgc 960
 25 gcttgcgaa tatcatgggt gaaatggcc gtttttctgg attcatcgac tggccggc 1020
 tgggtgtggc ggaccgtat caggacatag cttggctatc cctgtatattt gtcggagac 1080
 tggccggcga atgggtgtac egttccctcg tggccatcg tateccgcet cccgattcgc 1140
 agccatcgcc ctccatcgatc ctccctgtac agttttctcg agtttaaaca gaccacaaacg 1200
 gtttccctct aeggggatca atcccgcccc tccctccccc ccccccataa cgttaactggc 1260
 cgaaggccgt tggataaagg cccgtgtgcg tttgtctata tggattttt caccatattg 1320
 30 cctgttttgc gcaatgtgag gggccggaaa cttggccctt ttttttgc gggccatctt 1380
 aggggtttt cccctctcgca caaaggaaatg caaggctctgt tgaatgtctg gaaggaaagca 1440
 gttecccttgg aagetttctt gaaacaaaaca acgtctgtat cggcccttgc caggcagccg 1500
 aaccccccac ctggcgacac gtgcctctgc ggccaaaaggc acgtgtatata agataacac 1560
 gcaaaaggcgg cacaacccca gtggccatgtt gtggatggga taggttggaa aagatcaaa 1620
 tggctctcc caagcgattt caacaagggg ctggatggat cccggatggt accccattgt 1680
 atgggatctg atctggggcc tgggtgcaca tggccatgtat gtttttagtc gaggttaaaa 1740
 35 aacgtcttag ccccccggaaac cccggggacg tgggtttccct tggaaaaaca cgataataacc 1800
 atggcgecta ttacggccca ccccaacac acggggggcc tactccgttgc catcateact 1860
 agcctcacag gccgggacac gaaaccggac acggggggcc tactccgttgc tccaccgc 1920
 acacaatctt tccctggcgcac ctgcgtcaat ggccgtgttgc ggactgtcta tcatggtgc 1980
 ggcteaaga cccttggccgg cccaaagggc ccacccatccc aaatgttacac caatgtggac 2040
 caggccatcg tgggtggca aegcccccggggccgtt cttggatggcc atgcacccgtc 2100
 ggcagctccg acctttactt ggttccatgc tggccatggg tccatccgttgcgcggc 2160
 40 ggcgacagca gggggagcc actcccccggg aggccccgtt cctacttggaa gggctttcg 2220
 ggcggcctac tgctctggcc cccggggacg gtcgtggca tccctccggc tggccgtgtgc 2280
 accccggggg ttggaaaggc ggtggactt gtaccctgtt agttagtggaa aaccactatg 2340
 cggccccccgg tttccatcgca caactcgatc cccctccggc taccggccatc attccagggt 2400
 gccccatctat acgcccctac tggtagccgc aagagacta aggtggccggc tgcgtatgca 2460
 gccccaaagggt ataagggtgt tggccatgtt cccgttgcgc ccccccaccc aggtttccggg 2520
 gctgtatatgt ctaaggccatc tggatccac cccatccatc gaaacgggggt aaggaccatc 2580
 accacgggtt ccccccattatc gtaatccacc tatggcaatgt ttccctggca cgggtgggtgc 2640
 tctggggccg cctatgacat cataatatgt gatggatgc actcaactgatc tccgaccact 2700
 atccctggca tggccacatgtt cctggacca gccggagacgg ctggagccgc actcgatcg 2760
 ctggccacccg ctacgcctcc gggatccgc accgtggccac atccaaacat cgaggaggtg 2820
 45 gctctgttcc gcaatggaga aatccccctt tatggcaaaatccatccatc cgagaccatc 2880
 aaaaaaaaaa ggcacccatcat ttccatccatc tccaaagaaga aatgtatgatc gtcggccgc 2940
 aagctgtccg gctccggact caatgtgtat gcatattacc ggggccttgc tggatccgtc 3000
 ataccaacta gcccggacatgtt ctttgcgtatc gcaacggacgc ctctaatgac gggctttacc 3060
 ggcgatccgt actcaatgtt cggccatgttca cccggacatcg cggacttgcgc 3120
 ctggaccggc ctttccatccatc tggacccgc accgtggccac aagacggccgt gtcacgctcg 3180
 cagccggcgg gcaatggactgg tagggccagg atggccattt acagggtttt gactccaggaa 3240
 gaacggccctt cggccatgtt ctttgcgtatc gttttgttgc agtggatgc cgggggtgt 3300
 50 gcttggtaatc agtccatcgcc cggccggaccc tcaatgttgcgat tggggccatc cctaaacaca 3360
 ccagggttgc cccgttgcata gggccatctg tggatccatgc gggccatccatc agggccatc 3420
 accccatccatc acgcggccatccatccatc actaaaggccgg cggccatccatc ctcccccac 3480
 ctggtagatc accaggctac ggtgtgcgc accggccatccatc atcggtggac 3540

5 caaatgtgga agtgtctcat acggctaaag cctacgctgc acgggccaac gcccctgctg 3600
 tataaggctgg gagccgttca aaacgaggtt actaccacac acccataac caaatacatc 3660
 atggcatgca tgtcggctga cctggagggtc gtcacgagca cctgggtgct ggttagggcga 3720
 gtccttagcg ctctggccgc gtattgcctc acaacaggca gggtggctat ttgtggcagg 3780
 atcatcttgc cccgaaaagcc ggccatcatt cccgcacaggaa aagttcttta ccgggagttc 3840
 gatgagatgg aagagtgcgc ctcacaccc ctttacatcg aacaggaaat gcagctegcc 3900
 gaacaattca aacagaagge aatcggttgc ctgcaaaacag ccaccaagca ageggaggtc 3960
 gctgtcttca tggtggatac caagtgggg ccacctcgaa ccttctggc gaagcatatg 4020
 tggaaatttc tcaagcggat acaatattta gcacgttgc ccaactgc tggcaaaaa 4080
 gcgatagcat cactgtggc attcacagcc tctatcacca gcccgttca caccacat 4140
 accctctgt ttaacatctt gggggatgg gtggccccc aacttgttcc tccceagegtc 4200
 gctgtcttca tgtagggcgc cggcattcgatc ggagcgttgc ttggcagecat aggccctggg 4260
 aagggttgc tgatattttt ggacgggtt ggacggggg tggcagggcgc getctgtggc 4320
 tttaaaggta tgagcggcga gatgccctcc accggaggacc tggtaaacct actccctgtc 4380
 atcccttcccccc ctggcggccct agtcgtcggg gtctgtgcg cagcgatact gctgtggc 4440
 gtggggccag gggaggggggc tggcgtggat atgaacccgc tgatagcgtt cgttgcggg 4500
 ggttaaccacg tccccccac gcaactatgtc ctttacatcg acgtgcgc acgtgtca 4560
 cagatctctt ctgttcttac catcaatcg ctgctgaaga ggcttcacca gtggatcaac 4620
 gaggactgtt ccacgcccattt cttccggctcg tggetaagag atgtttgggat ttggatatgc 4680
 acgggttgc ctgttcttac gacccgttgc ctttacatcg tccttccgcg atttccggg 4740
 gttcccttctt ttcatgttca acgttggatc aagggttgc tggcgttgc cggcatc 4800
 caaaccaccc gccccatgtgg acaacatgc accggacatg tggaaacccgg tttccatgagg 4860
 atcgtggggc cttaggacatc tagtaacacg tggcattggaa cttttccat taacgcgtac 4920
 20 accacggggcc ctgtgcacgcg cttccggggc ccaaaattttt cttagggcgt gtgggggggt 4980
 gctgtctgggg agtacgtgg gtttacgcgg gtgggggatt tccactacgt gacgggcattg 5040
 accactgaca acgtaaatgt cccgtgtcag gtccggccccc cccaaattttt cacagaatgt 5100
 gatgggggtgc ggttgcacag gtacgttca cccgttcaaaac cccttcttacg ggaggagggtc 5160
 acatcttctgg tccgggttcaaa tcaataccctt ttttttttttccatgcg agtcccatgc 5220
 cccggatgtt ctttacatcg ttttttttttccatgcg accggacccctt cccacattac ggcggagacg 5280
 gctaagcgta ggttgcggcag gggatctccc ccccttttgg ccagcttacatc agctagccag 5340
 ctgtctgcgc ctcccttgaa gcaacatgc actaccatgc atgttttttttccatgc 5400
 ctcatcgagg ccaacatctt cttccggggcag gagatggggc ggaacatc tccgttgggg 5460
 tcagaaaaata aggttagtaat ttttttttttccatgcg tccggccgc tccaaacgggaa ggaggatgt 5520
 agggaaatgtt cccatcttgc gggatcttgc cggagggttca gggaaatcccc tccatgc 5580
 cccatatggg caegeccccggg ttacaacccctt ccactgttgc agtccctggaa ggacccggac 5640
 tacgttccctc ctgttgcgttca cttccggcttgc tccatgcg tccatgc 5700
 cccatccggg ggaagaggac ggttgcgttgc tccatgc tccatgc tccatgc 5760
 gagctcgcca caaaagacctt cccatccggg tccatgc tccatgc tccatgc 5820
 acggcccttc ctgaccatggc tccatccggg ggegacccgg gatccatgc ttttttttttccatgc 5880
 tccttccatgc cccatccggg tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 5940
 tctaccgttca gcgaggaggc tagtgaggac gtctgttgc ttttttttttccatgc 5940
 acaggcgccc tgatcaccgc atgcgttgc gggaaacca agtgccttgc ttttttttttccatgc 6060
 agcaacttctt tgcttgcgttca ccacaaatctt ttttttttttccatgc 6120
 35 ctggcggcaga agaagggttca ctttgcgttca ctggcgttca tggcgttca ctaccggggc 6180
 gtgtctcaagg agatgttgc gggatcttgc acaggatggc aatgttttttccatgc 6240
 gaagectgttca agtgcacgcg cccatccggg tccatgc tccatgc tccatgc 6300
 gacgttccggg acatccatccggg tccatgc tccatgc tccatgc 6360
 ctggaaagaca ctgagacatccggg tccatgc tccatgc tccatgc 6420
 gtccaaaccatggg agaagggggggg tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6480
 gttctgtgttgc gggatcttgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6540
 atgggtcttc ttttttttttccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6600
 40 gcttggaaatggc gggatcttgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6660
 acggctacttgc agaaatgttgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6720
 cccatccggg gacaggccat ttttttttttccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6780
 actaatttca aagggttgcgttca ttttttttttccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6840
 accagcttgcg ttttttttttccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6900
 aagctccagg actgcacatgc ttttttttttccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 6960
 gccccccatggg aagaggacgc gggatcttgc tccatgc tccatgc tccatgc 7020
 tctggccccc ctggggatccggg tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7080
 tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7140
 gccccccatggg aagaggacgc gggatcttgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7200
 tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7260
 acttcttctt ttttttttttccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7320
 atctacgggg ctttgcgttca ttttttttttccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7380
 catggccatggc gggatcttgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7440
 tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc tccatgc 7500

EP 1 043 399 A2

5 gtccgcgcta ggctactgtc ccaggggggg agggctgcca cttgtggcaa gtaccttcc 7560
 aactgggcag taaggaccAA gctaaaactc actccaatcc cggtcggtc ccagttggat 7620
 ttatccagct gggtcggtc tggtacAGC gggggagaca tatacacAG cctgtctcgT 7680
 gcccacccc gctggttcat gtgggccta ctccacttt ctgttaggggt aggcatctat 7740
 ctactccccca accgatgaac ggggagctaa acactccagg ccaataggcc atcctgtttt 7800
 tttccctttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttctcctttt 7860
 ttttccctct ttttttcctt ttcttcctt tggtggctcc atcttagccc tagtcacggc 7920
 tagctgtgaa aggtccgtga gccgcttgac tgcaGAGAGT gctgatactg gcctctctgc 7980
10 agatcaagt 7989

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 5
<211> 864

<212> DNA
<213> Hepatitis C Virus

5

<400> 5

10

15

20

23

30

23

70

43

50

55

5	aagggggggaa	ggcacccat	tttctgcatt	tccaaagaaga	aatgtatgya	gctcgcccg	3600
	aagctgtccg	gcctcgact	caatgtgt	gcattattacc	ggggccttga	tgtatccgtc	3660
	ataccacaacta	gcccggacgt	cattgtgt	geaacggacg	ctctaattat	gggtttaacc	3720
	ggcgatttcg	actcagtat	cgactcaat	acatgtgtca	cccagacat	cgacttcage	3780
	ctggaccggaa	ccttcacccat	tgagacqacg	acccgtccca	aaagacgcgtt	gtcaacgtcg	3840
	caggcgccag	gcaggactgg	tagggcagg	atgggcattt	acaggtttgt	gactccagga	3900
	gaacccggcc	cgggcatgtt	cgatttctc	gttctgtcgg	agtgtatgt	cgccggctgt	3960
	gttggtagc	agctcagcc	cgccggagac	tcagttatgt	tcggggctta	cctaaacaca	4020
	ccagggttgc	ccgtctggca	ggacatctgt	gaggttctggg	aaagcgttct	tacaggcctc	4080
	acccacatag	acgcccattt	cttgcctccag	actaaggcagg	caggagacaa	cttcccttac	4140
	ctggtagcat	accaggtac	ggtgttgcgg	agggtctcagg	ctccacccet	atcggtggac	4200
	caaatgtgg	agtgtctcat	acggcttaaag	cctacgtctc	acggggccaa	gccccctgtc	4260
	tataggctgg	gagccgttca	aaacgggggtt	actaccacac	aceccatataa	caaatatcat	4320
	atggcatgca	tgtcggtgt	cctgggggtc	gtcacgagca	cctgggtgt	gtttagggcga	4380
	gtccctagcg	ctctggccgc	gttattgtctg	acaacaggca	gggtgtgtat	tgtggggcagg	4440
	atcatctgt	ccggaaaggc	ggccatcttt	ccggacaggd	agtcgttta	ccggggatgc	4500
	gatgagatgg	aagagtgcgc	cttcacccctc	cettacatcg	acagggttat	gagctcgc	4560
	gaacaatcca	aacagaaggc	aatcggttgc	ctgaaaacag	ccaccaaaagc	agcggagget	4620
	gctgtccccc	tggtgaaat	caagtgggg	accctcgaag	ccttctgggc	gaagcatatg	4680
	tggaaatttca	tcagcgggtt	acaatattta	gcagggttgc	caactctgc	tggcaacccc	4740
	gcgatagcat	cactgtatgc	attcacaccc	ttatcatccaa	ggccgtctac	cacccaaatcat	4800
	acccctctgt	ttaacatctt	ggggggatgg	gtggccggcc	aacttgcctc	tcccgagcgt	4860
	gttctgtctt	tcgttagggc	cggtatcgct	ggagcggctg	ttggcagcat	agggcttggg	4920
	aagggtcttg	tggatatttt	ggcagggttt	ggagcgggg	ttgcaggcgc	gtctgtgtcc	4980
	ttaaagggtca	tgagccggca	gatgccttcc	accggaggacc	tgtttaacct	atccccctgt	5040
	atccatctccc	ctggccctt	agtcgtcggtt	gttgtgtcg	cagcgataact	gctgtggcac	5100
	gtggggccag	gggagggggc	tgtgcgttgg	atgaacccgc	tgatagcggt	cgcttcgccc	5160
	gttaaccacg	tctccccccac	gcactatgt	cctgagacgc	acgtgtcagc	acgtgtcaact	5220
	cagatctct	ctagttttat	catcactcg	ctgtgttgc	gttgcattca	gtggatcaac	5280
	gaggactgt	ccacggcat	ctccggctcg	ttggctaaag	atgtttggga	ttggatatgc	5340
	acgggttgc	ctgattttca	gacccgttgc	cagtcacacg	tecttgcggc	atggccggga	5400
	gttccccctt	tctatgtt	acgtgggtac	aaggggatct	ggcgggggat	cggtatcgat	5460
	caaaccaccc	gcccatgtgg	agcacaatgc	accggacatc	ttttttttcg	ttccatagg	5520
	atcggtgggc	ctaggacat	tagtaacacg	tggcatggaa	cattttccat	taacgcgtac	5580
	accacggggc	cctgcaccc	cttcccccgg	ceaaattattt	ctagggeget	gtggccgggt	5640
	gctgtctgg	agtaatgtt	ggttacgggg	gtgggggatt	tccatactgt	gacggggatc	5700
	accactgaca	acgttaatgt	ccccgtgtac	ttttccggcc	ccggatattt	cacacaaatgt	5760
	gatgggggtc	ggttgcacag	gtacgttca	gcgtgcaaac	cccttctactc	ggaggaggtc	5820
	acatttctgt	tcgggtcttac	tcaatattct	gttgggttca	agctccctat	cgagcccgaa	5880
	ccggacgttag	cagtgtcttac	ttccatgtct	accggacccct	ccacacattac	ggccggacgt	5940
	gctaqaacgt	ggctggccag	gggatcttcc	cccttcttgg	ccagctcatc	agctagccag	6000
	ctgtctgtcc	tttcctttaa	ggcaacatgc	actaccgttc	atgacttccc	ggacgtctac	6060
	cttcatcgagg	ccaaacctt	gtggccggag	gagatggggc	ggaaacttac	ccgggttggag	6120
	ttagaaaaata	aggtagtaat	tttggactt	ttagggccgc	tcaaaaggga	ggaggatgt	6180
	agggaaagtat	ccgttcccg	ggagatctt	cgagggttca	ggaaattttcc	tcggatcgat	6240
	ccatatctgg	cacggccggaa	ttacaaccc	ccactgttag	agteetggaa	ggacccggac	6300
	taatgttccct	cagtgttac	ccccgtgtca	tttgccttgc	ccagggcccc	tcggatacc	6360
	ccttcacccg	ggaaaggagg	gggttgcctt	tcagaaattd	ccgtgttgc	tgccttgcg	6420
	gagctcgcca	caaagaccc	cggtacgtcc	gaatcgctgg	ccgtcgacag	ccggacggca	6480
	acggctcttc	ctgaccac	ctccgtac	ggcacgttgc	gatecgacgt	tgagtcgtac	6540
	tcctecatgc	cccccttta	ggggggggcc	ggggatccgg	atctcgtat	ccgggttctgg	6600
	tctacatgtt	tcgggggg	tcgggggg	gttgcgttgc	gttcgtatgc	ctacacatgg	6660
	acaggcgccc	tgatcagcc	atgcgttgc	gaggaaatcc	agtcgttccat	caatgtcact	6720
	agcaacttctt	tgctccgtca	ccacaactt	gttcatgtca	caacatctcg	cagcgtcaac	6780
	ctggggcaga	agaagggttac	ctttgcacca	ctgcagggtt	ttggacggca	ctacccggac	6840
	gtgtcttcaag	agatggagg	ggagggttgc	acatgtttag	tcaaaatctt	atccgttgg	6900
	gaaggctgtt	agtcgtaccc	cccacatcc	gccagatca	attttgtca	ttggggcaaa	6960
	gacgtccgg	acetatccat	caagggcgtt	aaccacatcc	gttccgtgt	gaaggacttg	7020
	ctggaaagaca	ctggagaccc	aatttgacacc	accatcatgg	aaaaaaatgt	ggttttctgc	7080
	gttccaaaccag	agaagggggg	ccgcgaacca	gtctccatca	tctgtatccc	agattttggg	7140
	gttccgtgtgt	cgccggaaaat	ggccctttac	gtatgttgc	ccaccccttcc	tcaggccgtt	7200
	atgggtcttt	catacggtt	ccaataactt	cctggacacg	gggtcgagtt	cctgggtat	7260
	gcttggaaag	cgaaagaaatg	ccctatggcc	ttcgtatgt	acaccctgt	ttttgtactca	7320
	acggtcactt	agaatgtat	ccgtgttgc	gagtcataat	accatgttg	tgacttgg	7380
	ccccaaaccca	gacaggccat	aagggtcgtc	acagagccgc	tttacatgg	ggggcccccgt	7440
	actaatttca	aaggggcagaa	ctgcgttgc	cgccgttgc	ggcgagcg	tgtaactgtac	7500

EP 1 043 399 A2

accagctgcg gtaataccct cacatgttac ttgaaggccg ctgcggcctg tcgagctgcg 7560
aagctccagg actgcacat gctcgatgc ggagacgacc ttgtcgttat ctgtaaaagc 7620
5 gccccggacc aagaggacga ggcgagccca cgggcctca cggaggctat gactagatac 7680
tcgtcccccc ctggggaccc gcccaaacc aatacgact tggagttgat aacatcatgc 7740
tcctccaatg tgtcagtgc gcacgatgc tctggcaaaa ggtgtacta tctcaccctg 7800
gaccggccca ccccccattgc gccccgtgcg tggagacag cttagacacac tccagtcac 7860
tctggctag gcaacatcat catgtatgc cccacccctt gggcaaggat gatcctgatg 7920
actcatttct tctccatcct tctagctcag gaacaacttg aaaaaggccct agattgtcag 7980
10 atctacgggg cctgttactc cattgagcca cttgacactc ctcagatcat tcaacgactc 8040
catggccta ggcgcatttc actccatagt tactctccag gtgagatcaa tagggtgtgct 8100
tcatgcctca ggaaacttgg ggtaccgccc ttgcgagtct ggagacatcg ggccagaagt 8160
gtccgcgcta ggctactgtc ccaggggggg agggtgcaca cttgtggcaa gtaccttcc 8220
aactgggcag taaggacca gctcaaactc actccaatcc cggctgcgtc ccagttggat 8280
15 ttatccagct ggttcggtgc tggttacagc gggggagaca tatatcacag cctgtctcgt 8340
gcccgacccc gctggttcat gtgggtgccta ctcctacttt ctgttaggggt aggcatctat 8400
ctactcccca accgatgaac ggggagetaa acactccagg ccaataggc ateetgtttt 8460
tttccctttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttctcctttt 8520
tttttccctt ttttttcctt ttctttccctt tggtggctcc atcttagccc tagtcacggc 8580
tagctgtgaa aggtccgtga gccgcttgac tgcagagagt gctgatactg gcctctctgc 8640
20 agatcaagt 8649

25

30

35

40

45

50

55

<210> 6
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 6
 gccagcccc gattggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 ttttcacgca gaaaggctt accgcattggc tttagtatgg tgctcgccg cctccaggac 120
 cccccctcc gggagggca tagtggtctg cggaaaccgg gatgacaccg gaattccggc 180
 gacgaccggg tcctttttt gatcaaccgg ctaatgcct ggagattttq gcgtcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
 gtgttgcga gtccccccgg aggtctcgta gaccgtgcac catgagccac aatccaaac 360
 ctcaaaagaaa aaccaaaccg aacccaacg ggcgcgccccat gattgaacaa gatggattgc 420
 acggatgtc tccggccgt tgggtggaga ggttatttcgg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtc ctctgtatcc gccgtttcc ggctgtcage geagggggc cgggttctt 540
 ttgtcaagac cgaccgttcc ggtgccctga atgaactgcg gggacgaggca ggcggctat 600
 cgtggctgc cagcggggc gttcccttgc cagctgtgc cgcgggttc actgaagccg 660
 gaaggagctc gtcgtcttgg ggcggatgtc cggggcaggaa tctccctgtca ttcatccctt 720
 ctctgtccg gaaagtatcc atcatggct atgcaatgcg ggggctgcgat acgcttgatc 780
 cggctacccg cccatcgac cacaaggcg aacatcgat cgagcgagca cgtactcgga 840
 tggaaaggcc ttttgtcgat cagatgtatc tggacggaa gcatcaggggg ctcggcccg 900
 cggaaactttt ccggaggctc aaggcgcggc tgcccgcgg cgaggatctc gtcgtaccc 960
 atggcgatgc ctgttttgcg aataatcgatgg tggaaaatgg cgggtttttt ggattcatcg 1020
 atgtggccg gctgggggtg gcgaccgcg atcaggacat aegcttggtt acccggtata 1080
 ttgtcaaga gcttggccg gaatgggtg accgttccat cgtgttttac ggtatcgccg 1140
 ctccccatcc ggcggccatc gcttctatc gcttcttgc cgagttttt tgaggataaaa 1200
 cagaccacaa cggtttccct ttaggggat catttcgcg ccttccctc cccccccctt 1260
 aacgttactg gccgaagccg ctggaaataas ggccgggtgt cgtttgcata tatgttattt 1320
 tccacccat ttcggctttt tggcaatgtg aggggcccgga aacctggggc tgcgttcttgc 1380
 acgagatcc cttaggggtt ttccttcgc gccaaggaa tgcggatgtt gttgaatgtc 1440
 gtggaggaaag cagtttccctt ggaagcttcc tggaaagaaaaa caacgttgcgat aegcggccctt 1500
 tgcaggccgc ggaacccccc acettggcgc acgttgcctt gggccaaaa gcccacgtgt 1560
 taagatacac ctggcaaaagg ggcacaaccc cagtgccacg ttgtgagggt gatagtgtg 1620
 gaaaggatgc aaatggcttc ctcggatgt ttcacaaagg ggtcggaggaa tgcccaaggaa 1680
 gtaccaccat gtatggatc tgatctgggg ctcgggtgcgat cttttttttt acgtgtttag 1740
 tcggaggtaa aaaacgtcta ggccccccgg accacgggggat cgtgttttc ctttggaaaa 1800
 cacgataata ccatggccgcat tatacgccg tactccccc accacgggagg cttacttggc 1860
 tgcatcatca ctagccatcc agggggggc accgttgcgtc tgcggggggg ggtccaaatgt 1920
 gtctccaccc caaacacatc ttcttgggg accttgcgtca atggcggttgc ttggatgtc 1980
 tatcatggg cgggctcaaa gacccttgc gggccaaagg gcccacatcc ccaaatgtac 2040
 accaaatggg accaggacat cgtcggttgcg caagcgcccccc cggggggccgc ttctttgaca 2100
 ccatgacact gggcggatc ggaccccttac ttgttcaega ggcgttgcga tgcattttcc 2160
 tgccggccgc gggggggcggc ctttttttttccggc ttgttccatcccg ccaggccctg ctcttacttgc 2220
 aaggggcttt cgggggggtcc actgttgcgc cccttggggc atgtgttggg catttttccgg 2280
 gctggcggtt gcaaccgggg ggttgcgaag ggggttggact ttgttccatcccg cgagtctatg 2340
 gaaaccacta tgccggccccc ggttcttacg gacaactctg cccctttttccggc ctgttccggc 2400
 acatccggg gggcccatct acacggccctt actgttgcgtc gcaagagccac taaaatggccg 2460
 gttgtgtatg cagcccaagg gtataagggtt cttgtcttgc accccgttccgt cggccggacc 2520
 cttaggtttcg gggcgatata gtcataaggca catggatcg acccttaacat cagaacccggg 2580
 gttagggacca tcacccacggg tggcccccattc acgtatgcctt cctatggca gtttttgc 2640
 gagcggtttt gtcctggggg cgcctatgc atcataatat gtgtatggatg ccacttaact 2700
 gactcgacca tatacttggg catggcaca gtcctggacc aaggcgaggac ggttggaggcg 2760
 cgactcgatcg tgctcgccat cgttacggctt cgggggttccgg ttcacccgttcc acatccaaac 2820
 atcgaggagg tggcttgcgtc cagcaactgg gaaatccccctt ttatggca accccatcccc 2880
 atcgcgacca tcaagggggg gaggccatcc atttttgcctt attcacaaagg gaaatgtatg 2940
 gagctcgccg cgaacgttcc cggccgttgcg ctaatgtcg tagcatatata cggggggccctt 3000
 gatgtatccg tcataccaac tagggagac gtcatgtcg tagcaacggg cgctctaaatg 3060
 acggggcttca cggggatctt cgactcgatc atcgactgcg atacatgtt caccacgaca 3120
 gtgcacttca gcttggggcc gacccatccatc attggagacga cggccgttgcg acaagacccgg 3180
 gtgttgcacgt cggccggccg aggccggatc ggttggggca ggttgggtat ttacggatcc 3240
 gtgactccat gagaacggcc cttccggatcg ttgttgcgttcc ctttttttttccggc 3300
 gacgggggtt gtcctgggtt cgaatcgatc cccggccggaga cttcagtttgcgtt gttgggggtt 3360
 tacctaaacca caccggggctt gcccgttgcg caggaccatc ttttttttttccggc 3420
 ttatccaggcc tcacccatcatc agacggccatc ttcttttttccggc ccaggccgtca gggttccacc 3480
 aacttccctt accttggatc ataccaggatc acgggttgcgtt ccaggccgtca gggttccacc 3540

EP 1 043 399 A2

5 ccatcgtgg accaaatgtg ggagtgtctc atacggctaa agcctacgt gcacgggcca 3600
 acgcacctgc tgcataaggctt caaaaacgagg ttactaccac acaccccata 3660
 accaaataca tcatggcatg catgtcggt gacctgggg tcgtcacqg caccctgggt 3720
 ctggtaggcg gagtccttagc agctctggcc gcgatattcc tgacaacagg cagcgtggtc 3780
 attgtggca ggatcatctt gtccggaaag ccggccatca ttcccgacag ggaagtccct 3840
 taccggaggt tcgtatggat ggaagatgtc gcctcaaccc tcccttacat cgaacaggga 3900
 atgeagctcg cccaaacaaattt caaacagaatg gcaatcggtg tgcataacc acggccaccaag 3960
 caaaggagg ctgtgtctcc cgtgtggaa tccaaatggc ggaccctcg aacccttctgg 4020
 gegaagcata tggaaattt catcagcggg atacaatatt tagcaggctt gtccactctg 4080
 cctggcaacc cccggatagc atcactatgt gcattcacag cctctatcac cagccccgtc 4140
 10 accacccaaat taccatctt gtttaacatc ctggggggat ggttggccgc ccaacttgc 4200
 cctccagcg ctgtttctgc tttcgtagc gccggatcg tcggagcggc tggggcggc 4260
 ataggcattt ggaagggtgct tggatatttttggcgggat atggagcagg ggttggcggc 4320
 ggcgtcggtt cttttaaaggat catgagcggc gagatgcctt ccacggagga cctgggttaac 4380
 ctactccctg ctatcccttc ccctggccgc ctatgtcg ggttgcgtg cgcagcgata 4440
 ctgcgtcgcc acgtggggcc agggggggg gctgtcgatg ggttgcgtg gtttgcgtg 4500
 15 ttcgtttcgcc ggggttacca cgttccccc acgcaatgt tgctcgatgg cggccgtc 4560
 gcacgtgtca ctcagatctt ctctatgtt accatcaccc agtgcgtgaa gagggttcac 4620
 cagttggatc acggggactg ctccacgcgca tgcgtccggc ctgtgcgtaa agatgttgg 4680
 gattggatat gcaacgggtt gactgttcc aaggatccgc tccatgtccaa gtcctgccc 4740
 cgatttgcggg gatccccctt ctatgtcgatg caacgtgggtt acaaggggat gtcggggggc 4800
 gacggcatca tggaaaccac ctggccatgt ggagcacaga tcacccggaca tggaaatcc 4860
 gttttccatgtt ggatcgtggg gccttagggc tggatgttacaa cgttgcgtgg aacattcccc 4920
 20 attaaacggatc accacccaggg ccccttgcac cccctcccccgg cggcaatata ttctaggggc 4980
 ctgtggccggg tggctgtga ggagtacgtg gaggttacgc ggttggggga tttccactac 5040
 gtgacgggca tgaccactga caacgtaaag tgccctgtc aggttccggc ccccaattt 5100
 ttccacagaag tggatggggt gccgttgcac agtgcgtcc cagccgtgcaaa acccccttcata 5160
 cgggaggagg tccacattctt ggttgggtc aatcaatacc tggggggc acagtcggca 5220
 tgcggggcccg aaccggacgt agcgtgtc acttccatgc tcacccggacc cttccacatt 5280
 25 acggccggaga cggcttaacgc taggttgcggc agggatctt cccctccctt ggccagctca 5340
 tcagttgtcc acgttgcgtc gccttccctt aaggcaacat qcacttcccg tcatgtactcc 5400
 cgggacgtcg accctatcgca ggccaaacctt ctgtggccgc agagatggg cgggaaacatc 5460
 accccgttgg agtcagaaaa taaggtaga attttgact ctttcgagcc gtcctaaagcg 5520
 gaggaggatg agaggggatg atccgttccg gccggatgtcc tgcggaggc cagggaaattt 5580
 cctcgagatgt tgcccatatgtt ggcacggatc cttccactgtt agatgttccgg 5640
 aaggacccggg actacgtcccc tccatgttgcgca ccccttgcgtt cttccatgtt 5700
 30 cctccgatac caccttccacg gaggggagg acgggttgc tgcataatcc taccgtgtt 5760
 tctggcttgg cggagtcgtc cacaagggacc ttcggcgtt ccgtatgtcc gggccgtcgac 5820
 agcggcacgg caacggccctt tccatgtccg cecccttgcgtt acggggccgc gggatccggc 5880
 gttgatgtcgtt acttccatcat gggcccccggg gggggggatcc cttccatgtt 5940
 gacgggttcc tggatccatgtt aaggcggagg gctatgttgc acgttgcgtt ctgtcgatg 6000
 35 tccatgtccatggatccatgtt gggggggatcc cttccatgtt 6060
 gtcaatgtcac tggatccatgtt gggggggatcc cttccatgtt 6120
 cggcggccaa gctgtcgccca gaaagggttcc acctttgcac gactgttgc tacaacatct 6180
 cactaccggg acgtgtctcaaa ttttgcgtt cttccatgtt 6240
 ctatccgtgg aggaaggccgtt taatgttgc cggccagatc ttttgcgtt 6300
 tattggggcaaa agacgttccg gaaatccatcc agcaaggccg ttttgcgtt 6360
 tggaaaggact tgcgtggaaaga cacttgcgtt ccaatttgcac ccacatcat ggggggggg 6420
 gagggtttctt gcttccaaacc agagaagggg gggccgtt cttccatgtt 6480
 40 ccgatgttgg ggttgcgtt gttccatgtt acgttgcgtt ctccatgtt 6540
 cctcaggccg tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 6600
 ttccctggta atgcctggaa agcgaagaaat tttatggggc tttatggggc tttatggggc 6660
 tggatgttgcact caacggatc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 6720
 tggatgttgg ccccccggaaatc cttccatgtt 6780
 gggggcccccc tggatccatgtt taaaggccatgtt aacttgcgtt atccgggtt cccggccggc 6840
 ggtgtactgtc cggatgttggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 6900
 tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 6960
 atctgtgaaa ggcggggggc ccaaggaggatc gggggggatcc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7020
 atgacttagat acttccatgtt cttccatgtt 7080
 ataacatcat gcttccatgtt tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7140
 tatctccatcc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7200
 actccatgtca tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7260
 atgatccatgtca tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7320
 ctatgttgc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7380
 attcaacgc tccatggcc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7440
 aatagggttgg ctteatgtcc tttatggggc tttatggggc tttatggggc tttatggggc 7500

EP 1 043 399 A2

cgggccagaa gtgtccgcgc taggctactg tcccaggggg ggagggctgc cacttgtggc 7560
aagtacctt tcaactggc agtaaggacc aagctcaaac tcactccaat cccggctgac 7620
5 tcccagttgg atttatccag ctgggtcggt gctggttaca gcggggaga catatatcac 7680
agectgtctc gtgcccgaacc ccgcgtggtc atgtgggtgcc tactcctact ttctgttaggg 7740
gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaaatagg 7800
ccatccgtt tttttccctt ttttttttcc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
ttttctcctt tttttttctt ctttttttcc ttttcttcc tttgggtggct ccatttttagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaagggtccgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
10 tggcctctct gcaaatcaag t 8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 043 399 A2

```
<210> 7
<211> 11076
<212> DNA
<213> Hepatitis C Virus
```

	aaaaccccttgc	cctggccccac	ggactgtttc	cggaaagcacc	ccgaggcccac	ttacaccac	3600
5	tgtggttcgg	ggccttggtt	gacacccaga	tgcgggttc	actaccata	caggcttgg	3660
	cactaccctt	gcactgttca	cttattccat	tgcgggtta	ggatgtacgt	ggggggagtg	3720
	gagcacaggc	tgcggccgc	atgcattttg	actcgaggag	agcgttgtaa	cctggggac	3780
	aggggacagat	cagagcttag	ccggctgtc	ctgtttccaa	ccggatggca	gttattggcc	3840
	tgttcccttc	ccacccttacc	ggctctgtcc	actgggttga	tccatcttca	tcagaacgtc	3900
	gtggacgtac	aatactctgt	cggtttaggg	tgcgggttg	tctctttgc	aatcaaattgg	3960
	gagtatgttc	tgttcttctt	cctttcttgc	ggggacgcgc	cgctgtgtc	ctgtttgtgg	4020
10	atgtatgttc	tgtatgttc	actgtggcc	gccttagaga	actgtgtgtt	cctcaacacg	4080
	gcatccgtgg	ccggggcgc	tggcatttcc	tcttcttcg	tgttcttctg	tgtgtccctt	4140
	tacatcaagg	gcaggctgtt	ccctggggcg	gcatacgccc	tctacggcgt	atggccgcgt	4200
	ctccctgtcc	tgctgggtt	accacccac	gcatacgcca	tggggccggg	gatggccagca	4260
	tctgtgggg	gegegttgc	cgttagtctg	atacttttgc	cattgttca	gcaatataag	4320
	ctgttcttc	ctaggctcat	atgggtgtt	caatattttt	tcaccagggc	cgaggccac	4380
	ttgcaagtgg	ggatcccccc	ccctcaacgtt	cgggggggcc	gegatggccgt	catectcttc	4440
15	acgtgcgcga	tccacccaga	gctaattttt	accatccaca	aatcttctgt	cgccatatac	4500
	gggtccactc	tgttgcttca	ggctgttata	accaaaatgtc	cgactacttgc	gcccgcacac	4560
	gggtctattc	gtgcgttgc	gctgggtcg	aagggtgtc	gggggttatta	tgttccaaatgg	4620
	gctctctatc	agttggccgc	actgacaggt	acgtacgtt	atgaccatct	caccccaactg	4680
	cgggacttgg	cccacgcggg	cctcaagac	cttgcgttgc	cagggtggcc	cgtgtgtttc	4740
	tctgtatatgg	agaccaaaatg	tatcacctgg	ggggcagaca	ccggccgttg	tggggacatc	4800
	atcttgggg	tgcggcttc	cgccccgagg	ggggagggaga	tacatcttggg	acccggcagac	4860
20	agcccttgc	ggcagggggt	gcaacttctc	gcgccttatta	ccgcctacte	ccaacagac	4920
	cgagggctac	ttggctgtc	catcacttgc	ctcacagcc	ggggacaggac	ccaggtegag	4980
	ggggagggttc	aagtgggttc	caccgcaca	caatattttt	tggcgttgc	cgtcaatggc	5040
	gtgtgttgg	ctgtctatca	tggtgcggc	tcaagacccc	ttggcggccc	aaaggggcca	5100
	atcacccaaa	tgtacacca	tgtggaccag	gacccctgtc	gttggcaagg	gccccccccc	5160
	ggcggttct	tgacaccaat	cacccgtgg	agcttggacc	tttactttgt	cacggggat	5220
	ggccatgtca	ttccgggtcg	ccggccgggg	gacacggagg	ggggccctact	ctccccccat	5280
	cccgcttcct	acttgaaggg	cttttggc	ggtccactgc	tcttcccttc	ggggcatgt	5340
25	gtgggcgttc	ttccgggttc	cggtgtc	cgagggggtt	cgaaaggccgt	ggactttgtt	5400
	cccggtcgat	ctatggaaac	cactatgg	ttcccegggt	tcacatggc	cgttcccttc	5460
	ccggccgtac	cgcaagacat	ccagggtggc	cattatcac	cccttactgg	tagcgccaa	5520
	agcactaagg	tgccgggttc	gtatgcagcc	caagggtata	agggtgttgc	cctgaacccg	5580
	tccgtcgcc	ccacccatgg	tttgcggggc	tatatgttca	aggcacatgg	tatcgaccct	5640
	aacatcagaa	ccggggtagg	gaccatcc	acgggtgc	ccatcatgt	ctccacccat	5700
30	ggcaagttt	ttggcggac	ttgggttctt	ggggggccgt	atgacatcat	aatatgttat	5760
	gagtgcact	caactgtact	gaccactatc	ctgggcac	gcacagtctt	ggaccaagcg	5820
	gagacggctg	cgcgccgt	cgctgtgtc	gcacccgtt	cccttccggg	atcggtcacc	5880
	gtgccatc	caaacatcg	ggaggtggct	ctgtccag	ctggagaaat	ccctttttat	5940
	ggcaaagcc	ttccccatgc	gaccatca	ggggggggcc	acccatattt	ctgcceatatt	6000
	aagaagaaat	gtgtatgt	cgcccgaa	ctatccggcc	tcggactcaa	tgctgttagc	6060
35	tattttccgg	gccttgcgt	atccgtca	ccaaactacg	gagacgttca	tgctgttagc	6120
	acggacgttc	taatgacgg	cttacccgg	gatttgc	cagtgtatc	ctgcaatata	6180
	tgtgtccatcc	agacactgc	cttcaggttc	gaccgcac	tcacatgtt	gacggacgac	6240
	gtgcccacaa	acgcgggtgc	acgtctcg	cgccgaggca	ggacttggtag	gggcaggat	6300
	ggcatttata	gggttgcgt	tccagggaaa	ccggcccttgc	gcatgttgc	ttctctcggt	6360
	ctgtgcgt	gtatgtac	gggtgtgt	tgttgcac	tcacccccc	cgagaccc	6420
	gttaggttgc	gggttttac	aaacaccca	gggttgc	tctggccagg	ccatctggag	6480
40	ttcttgggaga	gggtttttac	aggccttac	cacatagac	ccatattttt	gtcccagact	6540
	aggcaggccg	gagacaactt	cccttacttc	gtatgcata	aggcttacgg	gtgcggccagg	6600
	gctcagggtc	cacccatccat	gtggggacaa	atgtgggt	gttctatc	gtctaaagct	6660
	acgtcgacg	ggccaaaccc	cctgtgtat	aggcttggag	ccgttccaaa	cgagggttact	6720
	accacacac	ccataacca	atacatcat	gatgtatgt	cggtgtac	ggaggttgc	6780
	acgacgaccc	gggtgtgtt	aggcgaggc	cttgcac	ttggccgtca	ttgcctgaca	6840
	acaggcagcg	tgtgttattt	ggggcaggatc	atcttgc	gaaaggccgc	catcattttc	6900
	gacaggccaa	tccttttacc	ggagttcgt	gatgtggaa	agtgcgc	acaccccttc	6960
	tacatcgaa	agggatgtca	gttcggca	caatttcaaa	agaaggcaat	cggggttget	7020
45	caaaacggca	ccaaggac	ggaggtgtt	gtcccccgtt	tggatccaa	gtggccgacc	7080
	ctcgaacgt	tctggcgaa	gcatatgtt	aaatttcat	gcccgtatca	atatttagca	7140
	ggctgttcca	ctctgttcc	caacccccc	atagcat	tgtatggcatt	cacagcttcc	7200
	atcaccagcc	cgetcac	ccaaatata	ctctgttta	acatcttgg	gggatgggt	7260
	ggccggccaa	ttgttcc	cagcgtgt	tctgtttc	taggcgc	cattcggttgc	7320
	gctgggttgc	gcatatgtt	cttggaa	gtgttgcgtt	attttgc	agggtatgttgc	7380
	gcaggggttgc	caggcgctt	cggttcc	aagggtat	gcccgttcc	ggccctccac	7440
50	gaggacatcg	ttaacact	ccctgtatc	cttcccttc	gccccttgc	cgtcggggtc	7500

gtgtgcgcag cgatactgcg tcggcacgtg ggcccagggg agggggctgt gcagtggatg 7560
 aaccggctga tagcgttgc ttcgcgggg aaccacgtt ccccaacgc cstatgttct 7620
 gagagcgcacg ctgcacgcacg tgtcaactcg atccctctca gtcttaccat cactcagctg 7680
 5 ctgaagaggc ttccaccaatg gatcaaccgag gactgttcca cgcctatgtc cggctcggtg 7740
 ctaagagatg ttggggattt gatatgcacg gtgttactg atttcaagac ctggctccaa 7800
 tccaagctcc tgccgcgatt gccccggatc ccctttttt catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagtcttgc gggggcgcacgg catcatgaa accacctgcc catgtggacg acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggttt catgaggatc gtggggctta ggacctgttag taacacgtgg 7980
 10 catggAACAT tccccattaa cgcgtacacc acggggccctc gcacgccttc cccggcgcca 8040
 aattattttc gggcgttgc ggggggtggg getggaggat acgtggaggt tacgcgggtg 8100
 ggggatttcc actacgtgac gggcatgacc actgacaacg taaaatgttcc 8160
 ccggcccccc aattttcac aagaatggat ggggtgcgt tgacacaggta cgctccagcg 8220
 tgcaaaaccc ttctacggga ggaggtcaca ttcttgcg ggetcaatca atacctgtt 8280
 gggtcacagc tccccatgegg gccccaaaccc gacgttagcag tgcacttc catgtcaacc 8340
 15 gaccctcccc acattacggc ggagacggct aacgttagc tggccagggg atctcccccc 8400
 tccttggcca gtcatcagc tagccacgtg tctgcgcctt ccttgaaggc aacatgcact 8460
 acccgatcatg actccccggg cgtgtacccatc atcgaggcca accttctgtg gggcaggag 8520
 atggggggga acatcacccg cgtggagtc gaaaataagg tagtaattttt ggacttttc 8580
 gagccgctcc aagcgagga ggatgagagg gaagtatccg ttccggcggg gatctgcgg 8640
 aggtccagga aattccctcg agcgatgccc atatgggac gccccgatta caaccctcca 8700
 20 ctgttagagt ctggaaaggc ccccgactac gtccttcagg tggtacacgg gtgtccatgg 8760
 ccgccttccca aggccccctcc gataccaccc tcaacggggg agaggacggt tgteetgtca 8820
 gaaatctaccg tgcgttgc cttggggag ctcgcaccaa gagaccttcgg cagctccgaa 8880
 tcgttcggccg tcgacagcgg cacggcaacg gcctctctc accagccctc cgacgcacggc 8940
 gacgcgggat ccgacgttga gtcgtactcc tccatgcccc cccttgaggg ggagccgggg 9000
 gatccccgatc tcagcgcacgg gtccttggctt accgtaacgc aggaggctag tgaggacgtc 9060
 25 gtctgtctgtc cgatgttccat ccatggaca ggcgccttgc tcacgccttgc cgtgtggag 9120
 gaaaccaacg tgccgttcaa tgcactgac aacttttc tccgttccca caacttggtc 9180
 tatgctacaa catctcgacg cgcacgcctg cggcagaaga aggttacccat tgacagactg 9240
 cagggttctgg acgaccacta cccggacgtg ctcaaggaga tgaaggcga ggcgtccaca 9300
 gttaaaggcta aacttttatac cgtggaggaa gcttgtaacg tgacgccttcc acatcgccc 9360
 agatcttaat ttggctatgg ggcacaaaggac gtcgggaaacc tatccacaa gggcgttaac 9420
 30 cacatcccgct ccgtgtggaa ggcactgtg gaagacactg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggccaa aaaaatgggtt ttcttgcgtc caacccagaga agggggggccg caagccagct 9540
 cgccttatecg tattcccaaga ttgggggggtt cgtgtgtcg agaaaaatggc cctttacgat 9600
 gtgggttccca ccctccctca ggcgtgtat ggcctttcat acggatttca atactctct 9660
 ggacacgcggg tcgaggcttctt ggtgaatgccc tggaaaggca agaaatgccc tatgggcttc 9720
 35 gcatatgaca cccgttgcgtt tgcactcaacg gtcactgaga atgcaccccg tggttggagg 9780
 tcaatctacc aatgttgc tttttttttt ccggccggcc gaaaggccacg agggccatacg gtcgttccaca 9840
 gagcgggctt acatcggggg cccctgtact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 40 cgggtggccgc cgagccgtgt actgacgacc agctgcggta ataccctcac atgttatttt 9960
 aaggccgtcg cggcctgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgtatgc cgtatgcggg 10020
 gacgacccgtcg tgggtatcg tggaaaggcg gggacccaaagg aggacggagg ggcctacgg 10080
 gccttcacgg aggctatgc tagataactct gccccccctg gggacccggc caaaccaggaa 10140
 tacgacttgg agttgataac atcatgttcc tcaatgtgt cagtgcgcac cgtatgcac 10200
 45 ggcacaaagggt tgacttatct caccctgtac cccaccaccc cccttgcggc ggctgcgtgg 10260
 gagacagcta gacacactcc agtcaattcc tggcttagca acatcatcat gatgcgcacc 10320
 accttgcgtgg caaggatgtat cctgtatgtc catttttttccatcccttctt agtgcaggaa 10380
 caacttggaaa aagccctaga ttgtcagatc tacggggctt gttacttccat tgagccactt 10440
 gacccatccctc agatccatca accgttccat ggccttagcg cattttacttccatagttac 10500
 tctccagggtg agatcaatag ggtggcttca tgccttcaggaa aacttgggggtt accggccctt 10560
 50 cgagttcgatc gacatcgccg cagaagtgtc cgcgttgcgtt tactgtccca gggggggagg 10620
 gctgcacccctt gtggcaagta ccttttcaac tggggcgttccaa ggaccaagttt cttttttttt 10680
 ccaatccccgg ctgcgtccca gttggatata tccatgtgtt cttttttttt ttatccatccat 10740
 ggagacatata atcacacgtt gtcgttgcgtt cttttttttt ttatccatccat 10800
 ctacttttttgc taggggttgg catatatctt cttttttttt ttatccatccat 10860
 ctccaggccaa ataggccatc ctgtttttttt ccctttttttt ttatccatccat 10920
 tttttttttt tttttttttt ttatccatccat 10980
 tggctccatc ttagccctag tcaacggctatc ctgtgaaagg tccgtgagcc gtttgactgc 11040
 agagagtgtt gatactggcc tctctgcaga tcaagt 11076

<210> 8
 <211> 8001
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 8
 gccagcccccc gattgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 ttttcacgca gaaagcgctt agccatggcg ttatgtatgg tgctgtcgac cttccagac 120
 ccccccctccc gggagacca tagtggctcg cggaaaccgg gatgtacaccg gaattggcag 180
 10 gacgaccggg tccttcttgc gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatggc ggctgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgtgggtc cgaaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 300
 gtgttgcga gtggcccg aggctcgta gaccgtgcac catgagcactg aatcttaaac 360
 ctcaaagaaa aacccaacg acggccat ggcgcgcct gatgtacaccg gatggatggc 420
 15 acgcagggtc tccggccgt tgggtggaga ggttattcg ctatgactgg gcacaacaga 480
 caatcggtcg ctctgtatgcc gccgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc cgggttctt 540
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgcctgaa atgaactgcg gacgaggac ggcgggttat 600
 cgtggctggc cacgacggc gttccctgca cagctgtct gcacgttgc actgaacggc 660
 20 gaaaggactg getctatggc gggagaatggc cggggcggat ttcctgtca ttcacccctt 720
 ctctgtccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg ggggtgtcat aegcttgatc 780
 cggttacatcg cccattcgac caccacggc aacatcgat ctagcgagca cgtactcgga 840
 tggaaaggccg ttttgcgtat caggatgtac tggacgaga gatcaggggc ctcggcgcag 900
 cggacttgtt cggcagggtc aagggcgc tgccgcacgg cggaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgttgcgg aatatactgg tggaaatggc cggctttct gatgtatcg 1020
 25 actgtggccg gctgggtgtg gcccggccgt atcaggacat aegcttggtc acccgtata 1080
 ttgtcaagaa gtttggggc gaaatgggtc accgttctt cgtgtttatc ggtatcgcc 1140
 ctccccatcc gcaacggcata gcttttatac gctttttttt cagatgttcc tgatgtttaaa 1200
 cagaccacaa cggtttccctt ctatggggat caatccggc cttctccctt cccccccctt 1260
 aacgttactg gccgaagccg ctttggaaataa ggccgggtgt ctgttgcata tatgttattt 1320
 30 tcaccatcat tcggcttctt tggcaatgtg aggccccggg aaccctggcc tgcgttctt 1380
 acgagcatcc ctatgggttctt tttcccttc gccaaaggaa tgcggatgtc gttgaatgtc 1440
 gttaaaggaaag cagtttctt ggaatgttctt tgaagacaaa caacgtcgatc aegccatctt 1500
 tgcaggcage ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gggccaaaaa gcaacgtgt 1560
 taagatacac gtcggaaaggc ggcacacccc cagtgccaaatc tggtggatgt gatgttgc 1620
 35 gaaaggatca aatggcttc ttcacggcata ttcacaaagg ggtgtaaagg tgcccaaaag 1680
 gtaccccatc gtatggatc tgatgtggg cctccgtgtca catgtttac atgtgtttag 1740
 tcgagggttaa aaaacgtcta ggccccccgg aaccacggggc cgtgttttc cttgtaaaaa 1800
 cacgataata ccatggcgcc tattatggcc tactcccaac agacgcgagg cttacttgc 1860
 tgcatacatca ctatggcttac agggccggc aggaacccgg tgggggggg ggttcaatgt 1920
 gttccacccg caacacacat tttctggcg acctgtgtca atgggtgtg ttggactgtc 1980
 tattatgtgt ccggctcaaa gacccttgcg gcccggaaaa gccaatcac ccaaatagtac 2040
 40 accaatgtgg accaggactt cgtgggtgtt cagggggggggc cttcttgcac atgtgttgc 2100
 ccatgtccatc gggggcgttcc ggacccatccat ttgtcaacg ggcacggcgtc tgcattttcc 2160
 gtggccggc gggggcggcag caggggggcgttccatcttcc ccaaggccgtt cttcttactt 2220
 aagggtcttt cggggcggtcc actgtcttcg ccttctggcc acgtgttggg catgttgc 2280
 gttggccgtgt gcaacccggg ggttgcgtt ggggtggact ttgttacccgt egagttatcg 2340
 45 gaaaccacta tgcgggttcc ggttccatcg gacaactcgcc ccccttccggc cgtaccggc 2400
 acatcccgagg tggcccatcc acacggccctt actgggtatcg gcaagaggac taatgttgc 2460
 gtcgtatgc cagcccaagg gtataagggtt ctgttgcata accccgtccgt cgccggccacc 2520
 ctatggtttcg gggcgatata gtcataaggca catggatcgacc acccttaatcat cagaatcg 2580
 gtaaggacca tcacccacgg tggcccatccat acgtacttca cttatggcaat gtttcttgc 2640
 gacgggttgtt gtttgggggg cgcctatgc atcataatat gtatgtatcg ccactcaact 2700
 gactcgacca ctatgttgcg catcgccaca gtcttgcacc aagggggggc ggttggagcg 2760
 cgactcgatcg tgctcgccac cgctacgtt cggggatcg tcaaccgtgc acatccaaac 2820
 atccgggggg tggctctgtc cagcacttgc gaaatccctt tttatggcaat agccatcccc 2880
 atcgagacca tcaagggggg gggccatctt attttctgc attcataagaa gaaatgtatcg 2940
 gagctcgccg cgaaggctgc cggccgttgc ctcaatgtcg tagcatat cccggggccct 3000
 50 gatgtatccg tcataaccac tagcgaggac gtatgtcg tagcaacggc cgctctaatt 3060
 acgggttttaa cgggtgactt cgacttgcgt atcactgtgtt caccctggacaca 3120
 gtcgtatcca gcttggggcc gacccatccat attagatggca caccgtggcc acaagacgcg 3180
 gttgtacgtt cggcggccgg aggccggact ggatggggca ggatggggcat ttacagggtt 3240
 gtgacttccat gagaacggcc ctcggccatg ttgttgcattt cgggttgcgtt cgagtgctat 3300
 gacgggggtt gttgttgcgtt cggacttgcgtt cccggccggaa cttcgttgcgtt gtttggggct 3360
 tacatccatca caccggggcc gggccgttgc cggccatccat ttttgcgttcc agactaaagca 3420
 ttacaggccc ttcacccatcat agacggccat ttttgcgttcc agactaaagca ggcaggagac 3480
 55 sacttccctt acctgtgtatc ataccaggctt acgggttgcgtt ccagggttgcgtt ggctccacat 3540

EP 1 043 399 A2

EP 1 043 399 A2

cgggccagaa gtgtccgcgc taggctactg tcccaggggg ggagggctgc cacttgtggc 7560
aagtacctt tcaactgggc agtaaggacc aagctcaaac tcactccaat cccggctgac 7620
5 tcccagttgg atttatccag ctggttcggt gctggttaca gcggggaga catatatcac 7680
agcctgtctc gtgcccggacc ccgcgtggtc atgtgggtgcc tactcctact ttctgttaggg 7740
gtaggcatct atctactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaataagg 7800
ccatcctgtt tttttccctt ttttttttcc tttttttttt tttttttttt 7860
tttttcttctt tttttttctt ctttttttcc ttttttttcc tttggtggtcc ccatcttagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaaggccgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
10 tggccctctt gcagatcaag t 8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 9
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

<400> 9
 gccagcccc gattggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 ttccacgca gaaaggctt agccatggc ttatgtatgg ttcgtcgac cttccagggc 120
 ccccccctcc gggagagcca tagtggctg cggAACCGGT gagtacaccg geattgcgg 180
 10 gacgacccggg tccttcttgc gatcaatcccg ctcatgcct ggagatggc gctgtcccc 240
 gcgagactgc tagccgatg gtgtgggtc gcggaaaggcc ttgtggtaact gctgtatagg 300
 gtgttgcga gtggccccc aggtctcgta gaccgtcgac catgagacacg aatcctaacc 360
 ctcaaagaaa aaccaaaacgt aacacaecg ggcggccat gatggaaaca gatggatgc 420
 acgcagggtc tccggccgtc tgggtggaga ggctattcg ctagtactgg gcacaacaga 480
 caatcggtcg ctctgtatgcc gccgttccc ggctgtcagc gcaggggcgc cgggttctt 540
 ttgtcaagac cgacgttgc ggtccctga atgaaactca gacggaggca ggcggctat 600
 cgtggctggc cacgacggc gttccctgc cagctgtct gcacgttgc actgaaggcg 660
 15 gaaggactg gctgtatgg ggcgaatgtc cggggcaggaa ttcctgtca ttcacccctt 720
 ctctggccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg ggggtgcata cgcgttgc 780
 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgat cgagcgagca cgtactcgga 840
 tggaaaggccg tcttgtcgt caggatgtc tggacgaga gcatcagggy ctcgcgcag 900
 cgcgaatgtt cgcggatgtc aaggcgcga tgccgcacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
 atggcgatgc ctgtgtccg aatatatgtt tggaaatgg cgcgtttctt gatgtatcg 1020
 20 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgtc atcaggacat ggcgttggct acccggtata 1080
 ttgtcaaga gtttggcgcg gaatggctg accgcgttctt cgtgtttatc ggtatcgcc 1140
 ctcccgattc gcacggcatac gccttctatc gccttcttgc cagatgttctc tgatgtttaa 1200
 cagaccacaa cgggttccctt ctageggat ctaatccccc ccttccttc cccccccctt 1260
 aacgttactg gccgaagccg cttgaaataa ggccgggtg cttttgtcta tatgttattt 1320
 tccaccatattt tggcgttctt tggcaatgtg aggccccggaa aacctggccc tgcgttcttg 1380
 25 acgagcattc ctatgggtt ttccttc gccaaaggaa tcaaggttgc ttgtaatgtc 1440
 gtaaggaaag cagtttctt ggaaggctt tgaagaaaaa caacgtctg aegacccctt 1500
 tgcaggcage ggaacccccc acctggcgac aggtgcctct gcggccaaaaa gccacgtgt 1560
 taagatacac ctgcaaaagc ggcacaaaccc cagtgcacgg ttgtggatgt gatgttgc 1620
 gaaaggagtca aatggcttc ctcacgttca ttcacaaacgg gctgtaaagg tgcccaaaag 1680
 gtaccccccattt gtatggatc tgatctggg ctcgggtgca catgtttac atgtgtttat 1740
 tcgagggttaa aaaacgttca ggcggcccgaa accacggggaa cgtgttttc ctttgaaaaa 1800
 30 caccataata ccatgggcac gaatcttcaa ctcctaaayaa aaaccaaaacg taacaccaac 1860
 cgccgccccac aggacgttca gttcccccgg ggtggatcga ttcgtcggtgg agtttacctg 1920
 ttggccgcga gggggccccc gttgggtgtc cgcgcgacta ggaagactc cgcgggttc 1980
 caacctcgta gaaggcgaca acctatcccc aaggtcgcc agccccgggg tagggcttgg 2040
 gtcacggccg gttacccctt gccccttatc gcaatgttggg gcttgggtgg ggcaggatgg 2100
 ctctgttca cccgtggctc tggctctgt tggggccca cggacccccc gctgtggatcg 2160
 35 cgcattttgg gtaaaggatc ctatccctc acgtcggtc tccggcgatct cttttttttttt 2220
 attcgcgtcg tggcgcccc ccttagggggc gtcgcacggg ccctggggca tggcgtccgg 2280
 gtcttggagg acggcgatgaa ctatgcaca gggaaatctgc cccgttgcctc ctttttctatc 2340
 ttectttttgg ctttgcgttc ctgtttggacc atcccgatc ctcgtatgtatc agtgcgeaaac 2400
 gttatccggag tttatccatgtt ctcacgttca gtcgttttttgc tttttttttttt 2460
 ggggacatga tcatgcatac cccgggtgc gtgccttgc ttcggggatca cttttttttttt 2520
 40 cgctgttggg tagcgctcac tcccacgttc gcgccggggaa acgtatgttgc ccccaactacg 2580
 acgatcacgc gccatgttca tttgttgcgtt gggggggctc ctctgttgc ctcgtatgtatc 2640
 gtgggagatc tctcggttgc ttttttttttgc ttcggccggggaa atgggttgc tttttttttttt 2700
 cggcacgaga cagttacaggaa ctgcatttgc tcaatataatc cccggccacgt gacaggttac 2760
 cgtatggctt gggatatgtat gatgtactgg ttcacccatc cggccctatgttgc 2820
 ttactccggaa tcccccacaaatc ttttttttttgc ttcggggatca cttttttttttt 2880
 45 gcccccccttgc ctactatctt ctttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 2940
 ctcttttgcgtt ggggttgcgtt gggggccat ttttttttttgc tttttttttttt 3000
 ctcgggattt ctttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3060
 aacggcagctt ggcacatcaa caggatgttgc ttcacccatc cttttttttttt 3120
 ttctttgttgc ctttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3180
 gccagcttgc gccccccatc ctttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3240
 ttcacacatgtt ctttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3300
 gtaccccgccg ctttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3360
 gggacgaccgg acgggttccgg ctttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3420
 ctgttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3480
 50 agcaactgggt ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc tttttttttttt 3540

5	aaaaccccttgc cctggcccac ggactgcttc cggaaagcacc ccgaggccac ttacaccac tgtgggttcgg ggccttggtt gacaccaga tgcgggttc actaccata caggcttgg 3660 caactccccct gcaactgtcaa cttttacate ttcgggtta ggatgtacgt gggggggagtg 3720 gagcacaggc tcaagggc atgcatttg actcgaggag cgctgttga cctggggac 3780 aggacagat cagagcttag cccgtgtctg ctgtctaca cgggtggca gtattggcc 3840 tgttccctca ccacccctacc ggctctgtcc actgggttga tccatctcca tcagaacgtc 3900 gtggggactg aatactctgtt cggtagatgg tgggggttg tctctttgc aatcaaattgg 3960 gagtatgtcc tgggtcttgc cttctttgc gggacgcgc gctgtgtc ctgttgg 4020 atgtatgtcc tgatgtctca agctgaggcc gcccstagaga acctgggttgc ctcacacccg 4080 gcateccgtgg cggggggcga tggattctc tccttctcg tggattctcg tgcgtctgg 4140 tacatcaagg gcagggttgc ccctggggcg gcatactgccc tctacggcg atggccgtc 4200 ctccctgtcc tgcgtgggtt accacacacca gcatacggca tggggggggg gatggcage 4260 tgcgtggggag ggccgggttt cgttagtctg atactcttgc tcttgcaccc gactataag 4320 ctgttctctg cttaggtctat atgggtttca caatattttca caccaggccc cgaggcacac 4380 ttgcggatgtt ggatcccccc ctcacacgtt cggggggggcc gctgtggcg catcctctc 4440 acgtggggat tccacccatgg gctaatttttcc accatcaccatc aaatcttgcg cggccatata 4500 gggtccactca tgggtcttgc ggctgttata accaaaggctt cgtacttctg cgcgcacac 4560 gggcctatcc gtgcacatgtt gctgggtcg aaggttgcgtt ggggttcttgc tgcggcaat 4620 gctctcatgtt agttggccgc actgacagggtt acgtacgtttt atgaccatctt caccactg 4680 cgggaaatggg cccacggggg ctcacagac cttgggggttgc cagttggcggc egtegttcc 4740 tctgtatatttgc agaccaaggat tataccatggg gggggcagaca cccgggggttgc tggggacat 4800 atcttggggc tggccgtctc cggccggagg gggagggaga tacatctggg accggcagac 4860 agcccttggaa ggcagggggtt ggcacttctc gcgccttattt cggccctactc ccaacagac 4920 cgagggcttac ttggctgtatc catcacttgc ctcacaggcc gggacaggaa ccaggctgg 4980 gggggggttgc aagtgggttc caccgcacaa caatcttttca tggcggacttgc cgtcaatggc 5040 gtgtgttggaa ctgtctatca tggtgccggc tcaaaagaccc ttggggggccc aaaggggccca 5100 atcaccccaaa tgcacccatgg tgggaccatgg gacccctgtcg gtcggcaagg gccccccccc 5160 gcgcgttcttgc tgacacccatgg caccctggggc agtcggacc ttactttgtt caccaggcat 5220 ggccatgtca ttccgggttgc cggccggggc gacacggggg ggacggctact ctccccccgg 5280 cccggtctcttgc acttgaagggtt ctcttctggc ggttccacttgc tctggcccttc ggggcacgt 5340 gtggggcatctt tgggggttgc cgtgtgtcc cgggggggttgc cgaaggcggtt ggactttgtt 5400 cccggttgcgtt ctatggaaac cactatggg tccctggggc tcaacggacatc ctcggccctt 5460 ccggccgttac cgcacacatgg ccagggtggc catcatacgtt cccctactgg tagccggca 5520 agcaactaagg tgccggcttc gtatgcacccca aagggttata aggtgtttgtt cctgaaaccc 5580 tccgtccggcc ccacccatgg ttccggggggc tatatgttca aggacacatgg tattgaccc 5640 aacatcagaaa tgggggttgc gaccatcacc acgggtggcc ccatcactgtt ctcacccat 5700 ggcaaggttc ttggccacgg tgggttgcgtt gggggggccatgg atacatcatc aatatgtgt 5760 gagtggccact caactgactt caccatcatac ctgggcattcg gcacagtctt ggaccaagcg 5820 gagacgggttgc gagcgcgtact cgtctgtcc gccacccgtt cccctccggg atccgttcc 5880 gtgccacatc caaatcatgtt ggagggttgc ctgtccatgg ctggagaaat ccccttttat 5940 ggcaaaggcca tccccatgtt gaccatcacc gggggggggc accttcattt ctgcacat 6000 aagaagaaat gtgtatgttgc cggccggaaat cttggacttgc tggacttca tgcgttagca 6060 tatttccggg gccttgatgtt atccgtatca ccaacttgcg gagacgttcatc tgcgttagca 6120 acggacgttcc taatgtacggg ctttacccgtt gacttgcgtt cgtgtatgttgc tgcacatata 6180 tgtgttccacc agacactgtt ctttacccgtt gaccacccgtt tcaccatgtt gaccacgac 6240 gtgcacacaag acgggggttgc acgetctgtcg cggcgaggca ggactgttgc gggcaggatg 6300 ggcattttaca ggtttgttgc tccaggaaat cggcccttgc gcatgttgc ttcctcggtt 6360 ctgtgggtgtt gctatgtacgg ggggttgcgtt tggtaeaggat tcaatggggc cggagaccc 6420 gttaggttgc ggggttacccatgg aaacacacca ggggttgcgtt ttcggccagg ccattttttt 6480 ttcttgggaga gctgtttttac aggccttacccatgg cccatagacg cccattttttt gtcggcagact 6540 aaggcaggcag gagacacatgg ccccttacccatgg tgcacatcc accgttacccgtt gtgcggccagg 6600 gtcttccatcc caccatgttgc tggggaccaat atgttgcgtt gtcctatcatc gctaaagcc 6660 acgtgtccggc ggccaaacggcc cctgtgtatgg aggttggggat cccgttccaaa cgggttactt 6720 accacacaccc ccataacccatgg atacatcatgtt gcatgttgcgtt cggctgtactt ggaggttgc 6780 acgaggacacctt ggggttgcgtt agggcggggc ttagcacttgc tggccggccatc ttgcctgaca 6840 acaggcaggc gttgttccatgg gggcaggatcc atcttgcgtt gaaaggccggc catcattttcc 6900 gacaggggaaat tcccttacccatgg ggggttgcgtt gatgttgcgtt agtgcggccctc acaccccttcc 6960 tacatcgttacccatgg ggggttgcgtt gatgttgcgtt gatgttgcgtt agtgcggccctc acaccccttcc 7020 caaaacggccca ccaaggacggc ggagggttgcgtt gtcctccgttgg tggaaatccaa gtggccggacc 7080 atcgaagccctt tcttggggaaat gcatatgttgcgtt aatttcatca gccgggatata atattttgtca 7140 ggcttgggttca ctcttgggttgcgtt caaccccccggc atagcatccatc tgcgttgcgtt caccacccctt 7200 atcaccacccatgg cggccgttgcgtt cccatccatccatgg cccatccatccatgg gggatgggttgc 7260 ggccggcccaat ttgttccatccatgg cccatccatccatgg cccatccatccatgg gggatgggttgc 7320 gggggttgcgtt gcaatgttgcgtt cccatccatccatgg cccatccatccatgg gggatgggttgc 7380 gcaggacgttgc cggccgttgcgtt cccatccatccatgg cccatccatccatgg gggatgggttgc 7440 gaggacgttgc ttaacccatccatgg cccatccatccatgg cccatccatccatgg gggatgggttgc 7500
---	---

EP 1 043 399 A2

<210> 10
<211> 8001
<212> DNA
<213> Hepatitis C Virus

5

<400> 10
ggcagcccc gattgggggc gacactccac catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgctc agccatggcg ttagtatgag tgctgtcag cctccaggac 120
ccccccctccc gggagagcca tagtggcttg cgaaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcccttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagcggagta gtgttgggtc cgaaaaggcc ttgtgttact gcctgtatagg 300
gtgttgcga tgccccggg agtgtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggccgcgcac gattgaacaa gatggattgc 420
acgcagggttc tccggccgt tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaaacaga 480
caatcggtc ctctgtatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc cgggttcttt 540
ttgtcaagac cgacactgtc tggtccctt atgaactgca ggacgggca ggcgggctat 600
cggtgctgc caccgggc gttccttgcg cagctgtcgc acgttgc actgaagcgg 660
gaagggactg gctgttattt ggcgaagtgc cggggcaggaa tctctgtca tctcacctt 720
ctccctgcgg gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gccgtgtcat acgcttgcate 780
cggttactcg cccatcgac caccacgcg aacatcgcat cgacgcgaca cgtactcgga 840
tggaaagccgg ttttgcgtat caggatgtc tgacaaaga gcatcagggg ctcgcgcag 900
ccgaactgtt egccaggctc aaggcgcgca tgcccgcagg cgaggatctc gtcgtgaccc 960
atggcgatgc ctgttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg ccgtttttt ggattcatcg 1020
actgttgcgg gctgggtgtg gggggcgcgt atcggacatc acgttgcgtt acccggtgata 1080
ttgtgaagi gcttggcgcg gaatgggtcg accgttcttc cgttcttac ggtatcgccg 1140
ctcccgatcc gcaagcgtatc gccttctatc gccttcttgcg cagtttctt cttgtttaaa 1200
cagaccacac cggtttccctt cttagcgggtat caatccgcgc cctctccctt cccccccctt 1260
aacgttactg gccggaaageg ctggaaataa ggcgggtgtg cttttgttata tatgttattt 1320
tccaccatata tggcttttgc tggcaatgtg aggggccggg aacatggccc tttttttttt 1380
acgagcattc cttaggggtct tttcccttc gccaaaggaa tgcaaggctc gttgaatgtc 1440
gtgaaggaag cagtttcttc ggaagettctc tgaagacaaa caacgtgtt acgcacccctt 1500
tgcaggcgcg ggaacccccc acctggcgcac aggttgcctt cggccaaaaa gccacgtgt 1560
taagatatac ctgcaaggc ggcacacccc ctagtgcaccc ttgttgcgtt gatagttgt 1620
gaaagatgc aatgttctc ctcacgcgtt ttcacaagg ggctgaaggaa tgccagaag 1680
gtaccccat tstatggatc tgatctgggg cctccgggtca catgttttac atgtttag 1740
tcgaggtaaa aaaaatctt gggcccccggaa accacggggg cgtgggtttt ctttggaaaaa 1800
cagataataa ccatggcgc tatatacgccc taactcccaac agacgcgagg cctacttggc 1860
tgcataatca cttagcttcac aggeccgggac aggaaccagg tcgagggggaa ggtcaagt 1920
gtctccaccg caacacaatc ttctctggcg acetgcgttca atggcgtgtt ttggactgtc 1980
tateatgtt cgggttcaaa gacccgttgc ggcggaaaggg ccccaatgtac 2040
accaatgtgg accaggaccc ctagtgcgtt ccaggcccccc ccaaatgtac 2100
ccatgcacctt gggcgcagtc ggaccccttac ttgttgcacgaa ggcacgcgc tgcattccg 2160
gtgcgcggc gggggcgcacag cagggggagec tctacttcc cccaggccgtt ctcctacttg 2220
aagggtctt cgggggttcc acgttgcgtt ccctcggggg acgttgcgtt cttttttttt 2280
gtgttgcgtt gacccggagg gtttgcgaag ggggttgcgtt ttgttccctt cggatctatg 2340
ggaaccacta tgcggcccc ggttccacg gacaactcg cccctccggc cgtaccgcag 2400
acattccagg tggcccatct acacggccctt actgttgcgtt gcaagagcac taagtgcgg 2460
gtgtcgatc tggcccaagg gtataagggtt cttgttgcgtt acccgttgcgtt cggcccccacc 2520
ctagggttgc gggcgatata tgcatacgca catgttgcgtt acccttaatcat cagaatcgcc 2580
gtaaaggacca tcaaccacggg tggcccccatac acgttactcca cctatgcac gtttcttgc 2640
gacgggtgtt gctctggggg cgcctatgcac atcataatata tgcgttgcgtt ccactcaact 2700
gactcgacca ctatcttggg catcgccaca gtccttgcac aacggggagac ggctggagcgc 2760
cgactcgatc tgcgttgcac cgcgttgcgtt cccggatcg gtcacccgttcc acatccaaac 2820
atcgaggagg tggcttgcgtt cagactgttgc gaaatccctt ttatggcaaa agccatcccc 2880
atcgagacca tcaagggggg gaggcaccctt attttgcgtt attccaagaa gaaatgtgt 2940
gagctcgccg cgaagctgtc cggccgttgcgtt ctcacatgttgcgtt tagcatatta cccggggccctt 3000
gatgttacttcg tcatatccatc tagcggttgcgtt gtcattgtcgtt tagcaacggaa cgctctatgt 3060
acgggttta cccggccactt cgcgttgcgtt acgttgcgtt atatgttgcgtt caccacggac 3120
gtcgacttca gcttgcgttgcgtt gacccgttgcgtt attgttgcgtt cgcgttgcgtt acatccaaac 3180
gtgtcgatc cgcgttgcgttgcgtt cccggatcg gtcacccgttcc acatccaaac 3240
gtgacttgcgtt gagaacggcc ctcgggttgcgtt ttcgttgcgtt cggatcttgcgtt cggatctatg 3300
gacgggggtt gtcgttgcgtt cgcgttgcgtt cccggccgaga ccttgcgtt gtttgcgtt cccggggccctt 3360
tacctaaca caccagggtt gcccgttgcgtt cggccatcc tgggttgcgtt ggagagcgac 3420
tttacaggcc tcaaccacat agaegcccat ttgttgcgttcc agactaaacca ggcaggagac 3480
aactccctt acgttgcgttgcgtt acgttgcgtt cccggccctt acgttgcgtt cccggccctt 3540

55

EP 1 043 399 A2

EP 1 043 399 A2

cgggccagaa gtgtccgcgc taggctactg tcccaggggg ggagggctgc cacttgcggc 7560
aagtacctct tcaactggc agtaaggacc aagctcaaac tcactccaat cccggctgcg 7620
5 tcccagtgg atttatccag ctggttcggt gctggttaca gcgggggaga catatatcac 7680
agccctgtctc gtgcccggacc ccgcgtgggtc atgtggtgcc tactcctact ttctgttaggg 7740
gtaggcatct atctaactccc caaccgatga acggggagct aaacactcca ggccaatagg 7800
ccatccgtt tttttccctt ttttttttc tttttttttt tttttttttt tttttttttt 7860
tttttcctt tttttttctt tttttttcc ttttctttcc tttgggtggct ccatcttagc 7920
cctagtcacg gctagctgtg aaaggtccgt gagccgcttg actgcagaga gtgctgatac 7980
10 tggcctctct gcagatcaag t 8001

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 11
 <211> 11076
 <212> DNA
 <213> Hepatitis C Virus

5 <400> 11
 gccagcccc gattggggc gacactccac catagatcac tccccctgtga ggaactactg 60
 tcttcaecga gaaagcgctc agccatggcg ttatgtatgc tgctcgac cctccaggac 120
 ccccccctcc gggagagcca tagtggctcg cggaaaccgg gatgtacaccg gaattggcc 180
 10 gacgaccggg tcctttctt gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatggc gctgtcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgtgggtc gcggaaaggcc ttgtggtaact gcctgatagg 300
 gtgtcgccg gtggccccc aggtctcgta gaccgtgcac catgagacac aatccaaac 360
 ctcaaagaaa aaccaaacg aacacaacg ggcgcggccat gatgtacaccg gatggatgc 420
 accgagggtc tccggccgt tgggtggaga ggctattcg ctatgactgg gcacaaacaga 480
 caatcggtc ctctgtatcc gccgtgttcc ggctgtcage gcaggggcgc ccggttttt 540
 ttgtcaagac cgacccgttc ggtgcctga atgaactgc gcacgaggac ggcggcgat 600
 cgtggctggc cacgacggc gttccttgc cagctgtgtc gcacgtgtc actgaagccg 660
 15 gaaggactg gctgtatcc gctggatgc cggggcggat tccctgtca ttccaccttg 720
 ctccgtccg gaaagtatcc atcatggc atgcaatgcg ggggtgtcat acgettgc 780
 cggctacccg cccatccgac caccaacggc aacatcgat cagacgagca cgtactcg 840
 tggaaaggccg ttttggat caggatgtc tggacgaa gcatcagggg ctggcgccg 900
 ccgaactgtt ccgcagggtc aacggcgc aatccatgg tggaaaatgg ccgttttctt 960
 atggcgatgc ctgttttgcg aatccatgg tggaaaatgg ccgttttctt 960
 20 actgtggccg gctgggtgtc gccggacccgt atcaggacat acgttggct accccgtata 1080
 ttgtcaaga gcttggggc gaatgggtc accgttctt cgtgttttca ggttgcggc 1140
 ctcccgatcc cgcggcgcate ccgttcttgc ccgttcttgc ccgttttctt 1200
 cagaccacaa cgggttccct ctageggat caatccgc cctcccccctt ccccccctt 1260
 aacgttactg gccgaaggcc cttggaaataa ggcgggtgtc cttttgtata tatgttattt 1320
 tccaccatc tggcgatcc tggcaatgtc aggccccggc aacctggcc tttttttttt 1380
 25 acgagccatc cttagggtctt ttcccttc gccaaaggaa tggaaaggct tttttttttt 1440
 gtgaaggaaag cagttctt ggaagttct tggaaagacaaa caacgtctgt tttttttttt 1500
 tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac aggtgcctt gggggccaaaa gccacgtgt 1560
 taagatacac ctgcggaaaggc ggcacaaaccc cagtgccatc ttgtggatgt gatgttgc 1620
 30 gaaagaggta aatggcttcc tcaacaggta tcaacaaagg ggctgaagg tgcccaagg 1680
 gtacccctt gtagggatc tgatctggg cctcggtgtc catgttttac atgttgc 1740
 tcgaggtaa aaaacgtcta ggccccccggc accacggggg cgtggtttttcccccctt 1800
 cacgataata ccatggccac gaatctaaa cctcaaaaya aaacccaaacg taacacccaaac 1860
 cggccccccac aggacgtcaa gttcccccggc ggtggtcaga tggccgtgt agtttaccc 1920
 ttggccgcga gggggccccc gttgggtgtc cgcggcacta ggaagacttc ccgggggtcg 1980
 caacccctgtg gaaggcgaca acctatcccc aaggtcgcc agccccgggg tagggcttgc 2040
 gctcggccgc ggtatcccttgc ccgttcttgc gcaatgggg gcttgggggtt ggcaggatgg 2100
 35 ctctgttca cccgtggcctc tggccttagt tggggccccca cggaccccccggc gctgtggatcg 2160
 cgcacattttgg gtaaggatcc tgcataccctc acgtcgccgt tggccgtatc catgggttac 2220
 attccgtctcg tcggccccc cctaggggc gctggccagg ccctggcgca tggcggtccgg 2280
 gttctggagg acggcgatgaa ctatgcaca gggaaatctgc cgggttgcctt cttttctatc 2340
 40 tttctttttgg ctttgcgtc ctgttttgc acceccatgt ccgtttatgc agtgcgaaac 2400
 gtatccggag ttagccatgt cacgaacgc tgcgttcaacg caagcattgt ttagtgaggca 2460
 ggggacatga tcatgcatac cccgggtgc gtggccgtcg ttggggagaa caactccccc 2520
 cgtctgtggg tagegtctac tcccaacgtc gggggccagg acgtctgtgtt ccccaactacg 2580
 45 aegatacgc gccatgtcg tttgtcgat ggggggggtc ctctgtgtc cgtatgtatc 2640
 gtggggatc tctggggatc ttttttttgc tgcggccagg ttttccatc tccgcctcgc 2700
 cggcacgaga cagtagggc ctgcatttc tcaatatac cccggccacgt gacagggtc 2760
 cgtatggctt gggatgtat gatgtactgg tcaacctacg cagccctatgt ggtatcg 2820
 ttactccggg tcccaacaaacg tggcggtat atgtggggc gggcccccgtt gggaggctca 2880
 gcccccccttgc cctatatttc catgtggggg aactgggtca aggttctgtat tggatgtatc 2940
 ctctttgtcc gctgttgcgg gggaaacctat gtgacagggg gacgtatggc caaaaaaaaacc 3000
 50 ctccggattt cgttttttgc ttccacccggg tcatcccaaga aatccagct tggatggatcc 3060
 aacggcagctt ggcacatcaa caggactgc ctgaaactgc atgactccctt caacactggg 3120
 ttccctgtcg cgtgtttca cgtgcacaag ttcacactgc tggatgtccca agagcgatcg 3180
 gccaggtcgca gccccccatcg cgcgttgcgt cagggggtgg gggccatccatc ttacaatgt 3240
 tcacacagctt cggaccaggag gcctttatgt tggcactacg cccccccggcc gtcgggtatc 3300
 gtaccccgccg cgcaggatgt tggcggtatc tactgttca ccccaagccca gtcgtgtgt 3360
 gggggacccy acggggatcc cgtcccttgc tggatggggg gggaggatgt gacgggtatc 3420
 ctgtttttca aacacacccg gccgcggccaa ggcacactgtt tggcggtac atggatgtatc 3480
 agcactgggt tcaccaagac gtgcgggggc ccccccgtgtt acatcgggggg gatcggtatc 3540

EP 1 043 399 A2

5 gtgtgcgcag cgataactgcg tcggcacgtg gccccaggaa agggggctgt gcagtggatg 7560
 aaccggctga tagcgttcgc ttcgcggggg aaccacgtt ccccaacgca ctatgtgcct 7620
 gagagcgcacg ctgcacgcacg agtcaactcg atcctctcta gtcttaccat cactcagctg 7680
 ctgaagaggc ttccacaggc gatcaacgag gactgtccca cccatgcctc cggctcggtg 7740
 ctaagagatg ttgggattg gatatgcacg gtgttactg attcaagac ctggctccag 7800
 tccaagctcc tgccgcgatt gcccggggatc cccttcttct catgtcaacg tgggtacaag 7860
 ggagtctggc gggcgacgg catcatgcaa accacatgcc catgtggagc acagatcacc 7920
 ggacatgtga aaaacggttc catgaggatc gtggggctt ggacctgttag taacacgtgg 7980
 catgaaacat tcccatcaa cgcgtacacc acggggccctc gcacgcctc cccggcgcca 8040
 10 aattattcta gggcgtgtg ggggttaggt gctgaggagt acgtggaggt tacgccccgt 8100
 ggggatttcc actacgtac gggcatgacc actgacaaacg taaatgtccccctt gtgtcagggt 8160
 ccggccccccg aattttcac aagaatggat ggggtgggt tgacacaggta cgctccagcg 8220
 tgcaaaccctt ccctacgggaa ggaggtcaca ttccctgtcg ggctcaatca atacctgttt 8280
 gggtcacagc tcccatgcga gcctgaaccc gatgtacccg tgctcaactc catgctcacc 8340
 gaccctcccc acatcacggc ggagacggct aagcttaggc tggccagggg atctcccccc 8400
 15 cccttggcca gtcatacgc tagccacgtg tctgcgcctt cctgtggggc aacatgcact 8460
 acccgatcatc actccccggc cggtgcaccc atcgaggccaa acctcttg gggcaggag 8520
 atggcgccggaa acatcaccccg ctgtggatca gaaaataagg tagtaatttt ggactctttc 8580
 gagccgtcc aaggcgagga gatgtacccg ggagtatccg ttccggcgga gatcctgcgg 8640
 aggtccagga aattccctcg agcgtatgcct atatggcac gcccggattt caaccctcca 8700
 ctgttagagt ccttggaaacccggactac gtcctccatc tggtagacccg gtgtccattt 8760
 20 ccgcctggca aggccccctt gataccaccc tcaaggagga agggacggg tgccctgtca 8820
 gaatctaccg tgcgttctgc cttggcgagg ctgcacccacg agaccccttcg cagctccgaa 8880
 tcgtcgcccg tcgacagcgg cacggcaacg gcctctctc accagccctc cgacgcacggc 8940
 gacgcgggat ccgcacgttgc gtcgtactcc tccatggccc cccttggggg ggagccgggg 9000
 gatcccgatc tcagcgcacgg gtcttggctt accgtaacg aggaggctag tgaggacgtc 9060
 gtctgtctgt ctgtgttccata catatggaca ggcgccttgc tcacgccttgc cgtcgccgg 9120
 25 gaaaccaacg tgcccatcaa tgcactgacg aactcttgc tccgcattca caacttggtc 9180
 tatgctacaa catctcgacg cgccaaacctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactc 9240
 cagggtctgg acgaccacta cccggacgtg ctcaaggaga tgaaggcgaa ggcgtccaca 9300
 gttaaaggcta aactcttacatc cttggggggggccctgttgc tgacgcggggg acattcgccc 9360
 agatctaaat ttgggtatgg gycggaaaggac gtcggggaaatccatccatc ggcgtttaac 9420
 30 cacatccgct ccgtgtggaa ggcgttgc gacagacgtg agacaccaat tgacaccacc 9480
 atcatggcaaaaatggat tttctgcgtc caaccaggaga agggggggccg caagccacgt 9540
 cgccttatecg tattttccaga tttgggggtt cgtgtgtcg agaaaaatggc cttttacat 9600
 gtggtctcca ccctccctca ggccgtgtat ggctcttcat acggatttca atactctct 9660
 ggacagcggtt tcgagtcttgc tggtaatccg tggaaaggca agaaatggcc tatggcttc 9720
 gcatatgaca cccctgttt tgcactcaacg gtcactgaga atgacatccg tggtagggag 9780
 tcaatctacc aatgttgc tttggggggggccctgttgc gacacccatggccatca gtcgtcaca 9840
 35 gagcggtttt acatcggggg cccctgtact aattctaaag ggcagaactg cggctatcgc 9900
 cgggtccgcg cgaggcggtt actgacgacc agctgcgttgc atacccttac atgttactt 9960
 aaggcccgctg cggccgtcg agctgcgaag ctccaggact gcacgtatgc cgtatgcgga 10020
 gacgaccccttgc tggatctgc tggatccatc ctttttttttggccatccatc gacccatcc 10080
 gccttcacgg aggctatgac tagatactct gccccccctg gggacccggc caaaccaggaa 10140
 tacgacttgg agttataaac atcatgtcc tccaatgtgt ctttttttttgcgtcgca cgatgcact 10200
 40 ggcaaaaagggttgtactatct caccgcgtac cccaccaccc cccttgcgcg 10260
 gagacatcgacactcc agtcaattcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgc 10320
 accttgggggcaaggatgtatcctgtatccatc ctttttttttgcgtcgca agctcaggaa 10380
 caacttggaaa aaggcccttgc tggatccatc tggatccatc gtttttttttgcgtcgca tgagccactt 10440
 gacccatccatc agatcatccatc acgactccat ggccttagcg ctttttttttgcgtcgca ccatagttac 10500
 tctccagggtt agatcatatag gtttttttttgcgtcgca tggatccatc tggatccatc accggccctt 10560
 45 cgagtctggaa gacatcgggc cagaagggtgc cggcttaggc tactgtccca gggggggagg 10620
 gctgcaccccttgc tggatccatc ctttttttttgcgtcgca gggccatccatc ctttttttttgcgtcgca ctttttttttgcgtcgca 10680
 ccaatcccccgttgcgtccatc gtttttttttgcgtcgca tggatccatc tggatccatc tggatccatc ttttttttttgcgtcgca 10740
 ggagacatcatc acatccatc gtttttttttgcgtcgca ctttttttttgcgtcgca tggatccatc tggatccatc ttttttttttgcgtcgca 10800
 ctactttctgttgc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc ttttttttttgcgtcgca 10860
 ctccaggccatc ataggccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc ttttttttttgcgtcgca 10920
 50 tttttttttgcgtcgca tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc tggatccatc ttttttttttgcgtcgca 10980
 tggatccatc ttagcccttag tcacggcttag ctgtgaaagg tccgtgagcc gcttgcactc 11040
 agagatgtgttgc gatactggcc tctctgcaga tcaatgtgttgc 11076

Patentansprüche

1. Hepatitis C Virus (HCV) Zellkultursystem, das im wesentlichen eukaryontische Zellen umfaßt, die eingeschleustes HCV-spezifisches Genmaterial enthalten, dadurch gekennzeichnet,

5 daß die eukaryontischen Zellen humane Hepatomazellen sind und daß das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt ist, das die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt.

- 10 2. Zellkultursystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß die Hepatomazellen von einer handelsüblichen Hepatomazelllinie abstammen.

- 15 3. Zellkultursystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

daß die Hepatomazellen aus einer Hepatoma primärzellkultur gewonnen sind.

- 20 4. HCV-RNA-Konstrukt, dadurch gekennzeichnet,

daß es die HCV-spezifischen RNA-Abschnitte 5' NTR, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B und 3' NTR und zusätzlich ein selektierbares Markergen (Selektionsgen) umfaßt.

- 25 5. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,

daß es eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Sequenzprotokolle SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 11 umfaßt.

- 30 6. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,

daß die 3' NTR eine Nukleotidsequenz aufweist, die aus der Gruppe der nachfolgend aufgelisteten Nukleotidsequenzen (a) bis (i) ausgewählt ist:

35 (a) **ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGTTTTTTT
TTAGCTTTTTTTTTCTTTTTTTGAGAGAGAGAGTCTCACTCTG
TTGCCCACTGGAGT**

40

45

50

55

- (b) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
5 TTTTAGTCT TTTTTTTTC TTTTTTGAGAGAGAGT
CTCACTCTGT TGCCCAGACT GGAGC
- (c) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
10 TTAATCTT TTTTTTTCT TTTTTTGAGAGAGAGT
CTCACTCTGT TGCCCAGACT GCAGC
- (d) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
15 TTTTAGTC TTTTTTTTC TCTTTTTTGAGAGAGAG
AGTCTCACTC TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (e) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
20 TTTTAGTCT TTTTTTTTC TCTTTTTTGAGAGAGAG
AGTCTCACTC TGTTGCCAG ACTGGAGT
- (f) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
25 TTTTAGTCT TTTTTTTTC TCTTTTTTGAGAGAGAG
GAGTCTCACT CTGTTGCCCA GACTGGAGT
- (g) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
30 TTTTAGTCT TTTTTTTTC TCTTTTTTGAGAGAGAG
GTCTCACTCT GTTGCCAGA CTGGAGT
- (h) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
35 TTTTTAACT TTTTTTTTC TTTTCCTT TTTTGAGAGAG
GAGAGTCTCA CTCTGTTGCC CAGACTGGAG T
- (i) ACGGGGAGCTAACACTCCAGGCCAATAGGCCATCCTGT_{TTTTTT}
40 TTTTTAACT TTTTTTTTC TTTCTTTT TTTTGAGAGAG
AGAGAGTCTC ACTCTGTTGC CCAGACTGGA GT

- 45 7. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
daß das selektierbare Markergen ein Resistenzgen und insbesondere eine Antibiotikaresistenzgen ist.
- 50 8. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
daß das selektierbare Markergen ein Neomycinphosphotransferasegen ist.
- 55 9. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
daß das selektierbare Markergen strangabwärts der 5' NTR in die HCV-RNA integriert ist.
10. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 9, dadurch gekennzeichnet,

EP 1 043 399 A2

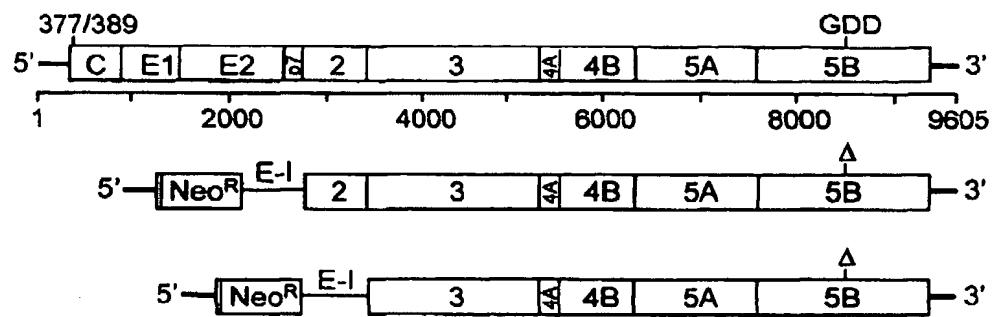
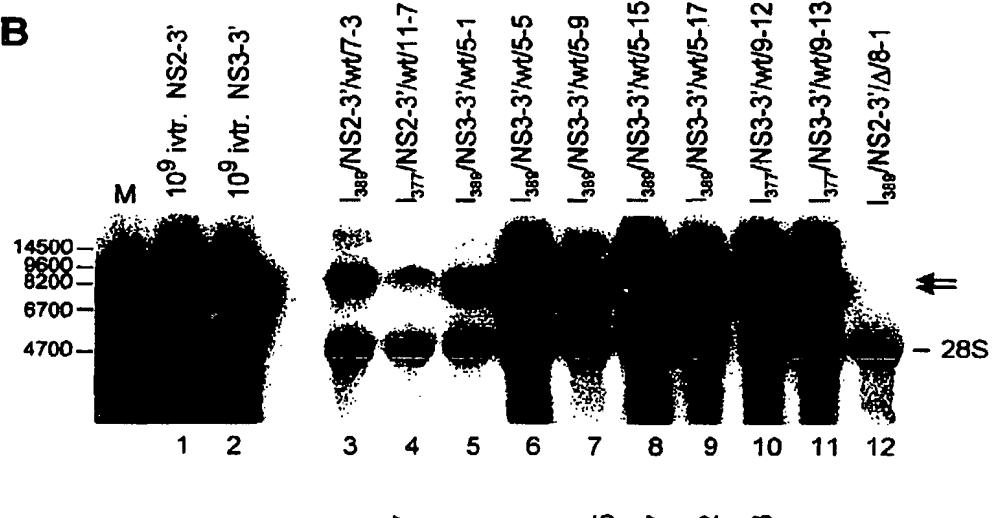
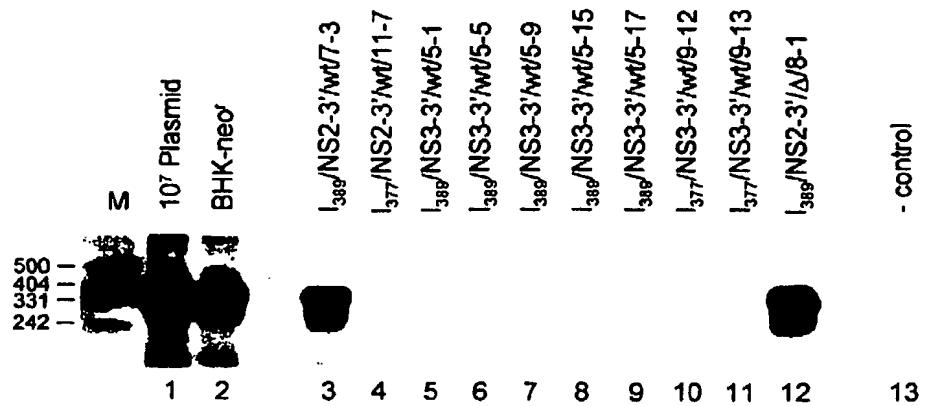
daß das selektierbare Markogen über ein Ribozym bzw. eine Erkennungsstelle für ein Ribozym mit der HCV-RNA verbunden ist.

11. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet,
 - 5 daß es ein integriertes Reportergen aufweist.
12. HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,
 - 10 daß das Reportergen ein Gen aus der Gruppe der Luziferasegene, dem CAT-Gen (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen), dem lacZ-Gen (beta-Galaktosidasegen), der GFP-Gen (green-fluorescence-protein-Gen), dem GUS-Gen (Glukuronidasegen) und dem SEAP-Gen (Sezernierte-Alkalische-Phosphatase-Gen) ist.
13. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 11, dadurch gekennzeichnet,
 - 15 daß deren Replikation die Expression eines (zellulären) Surrogatmarkergens beeinflußt.
14. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet,
 - 20 daß das Resistenzgen derart in das offene Leseraster der HCV-RNA einkloniert ist, daß es erst nach einer proteolytischen Prozessierung in eine aktive Form überführbar ist.
15. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet,
 - 25 daß das Reportergen und das selektierbare Markogen derart räumlich in dem Konstrukt angeordnet sind, daß sie gemeinsam ein Fusionsprotein exprimieren.
16. Zellkultursystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet,
 - 30 daß das HCV-RNA-Konstrukt ein Konstrukt gemäß wenigstens einem der Ansprüche 4 bis 15 ist.
17. Zellkultursystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
 - 35 daß die das HCV-RNA-Konstrukt enthaltenden Zellen bei der DSMZ, Braunschweig, BRD, unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC2394 (Laborbezeichnung HuBl 9-13) hinterlegt sind.
18. Verwendung eines Zellkultursystems nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 16 bis 17 und/oder eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 4 bis 15 zur Herstellung und/oder Evaluierung und/oder Testung von Therapeutika und/oder Diagnostika zur Behandlung von insbesondere HCV-Infektionen.
 - 40
19. Verwendung eines Zellkultursystems nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 16 bis 17 und/oder eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 4 bis 15 zur Herstellung eines Impfstoffes gegen HCV-Infektionen.
 - 45
20. Verwendung eines HCV-RNA-Konstrukts nach einem der Ansprüche 4 bis 15 zur Herstellung einer leberzellspezifischen Genfähre für die Gentherapie .
 - 50
21. HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 15, dadurch gekennzeichnet,
 - 55 daß es ein integriertes Fremdgen aufweist und dazu geeignet ist, dieses Fremdgen in eine Zielzelle einzuschleusen, die zur Expression dieses Fremdgens geeignet ist.
22. Verfahren zur Gewinnung von zellkultur-adaptierten Mutanten eines HCV-RNA-Konstrukts gemäß einem der Ansprüche 4 bis 15, wobei die Mutanten gegenüber dem HCV-RNA-Konstrukt eine erhöhte Replikationseffizienz aufweisen, dadurch gekennzeichnet,
 - 55 daß man ein Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial ein HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen nach einem der Ansprüche 4 bis 15 ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, daß man die gewachsenen Zellklone erntet, und daß man

EP 1 043 399 A2

aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte oder Teile davon isoliert.

- 23.** Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet,
- 5 daß man die isolierten HCV-RNA-Konstrukte wenigstens einmal erneut passagiert, nämlich in Zellen eines Zellkultursystems nach Anspruch 1 einschleust, das dabei erhaltenes Zellkultursystem gemäß Anspruch 1, bei dem das eingeschleuste HCV-spezifische Genmaterial das isolierte HCV-RNA-Konstrukt mit Selektionsgen ist, auf/in dem dem Selektionsgen entsprechenden Selektionsmedium kultiviert, die gewachsenen Zellklone erntet und aus diesen Zellklonen die HCV-RNA-Konstrukte isoliert.
- 10 **24.** Verfahren zur Herstellung von Mutanten eines HCV-Vollängengenoms oder eines HCV-Teilgenoms oder eines beliebigen HCV-Konstrukts mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom oder -Teilgenom oder HCV-RNA-Konstrukt erhöhter Replikationseffizienz, dadurch gekennzeichnet,
- 15 daß man mit einem Verfahren nach Anspruch 22 oder 23 eine zellkultur-adaptierte Mutante eines HCV-RNA-Konstrukts herstellt und isoliert,
daß man die Nukleotid- und Aminosäuresequenz dieser Mutante bestimmt und durch Vergleich mit der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukts die Art, Anzahl und Positionen der Nukleotid- und Aminosäuremutationen bestimmt,
- 20 und daß man diese Mutationen entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten, in ein (isoliertes) HCV-Vollängengenom oder ein HCV-Teilgenom oder ein beliebiges HCV-RNA-Konstrukt einführt.
- 25.** Zellkultur-adaptiertes HCV-RNA-Konstrukt mit hoher Replikationseffizienz, dadurch gekennzeichnet,
- 25 daß es durch Nukleotid- und/oder Aminosäure-Mutationen von einem HCV-RNA-Konstrukt nach einem der Ansprüche 4 bis 15 ableitbar ist und daß es mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24 erhältlich ist.
- 30 **26.** Zellkultur-adaptiertes HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet,
- daß es einen oder mehrere der nachfolgend aufgeführten Aminosäureaustausche aufweist, nämlich 1283 arg -> gly und/oder 1383 glu -> ala und/oder 1577 lys -> arg und/oder 1609 lys -> glu und/oder 1936 pro -> ser und/oder 2163 glu -> gly und/oder 2330 lys -> glu und/oder 2442 ile -> val aufweist.
- 35 **27.** Zellkultur-adaptiertes HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet,
- daß es einen oder mehrere der in Tabelle 3 aufgeführten Nukleotid- und/oder Aminosäureaustausche aufweist, wobei Tabelle 3 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
- 40 **28.** Zellkultur-adaptierte Mutanten eines HCV-RNA-Konstrukts oder eines HCV-Vollängengenoms mit im Vergleich zu dem ursprünglichen HCV-RNA-Konstrukt oder dem ursprünglichen HCV-Vollängengenom erhöhter Replikationseffizienz, dadurch gekennzeichnet,
- 45 daß sie mit einem Verfahren erhältlich ist, bei dem man in einem zellkultur-adaptierten HCV-RNA-Konstrukt nach Anspruch 24 durch Sequenzanalyse und Sequenzvergleich die Art und Anzahl der Mutationen bestimmt und diese Mutationen in ein HCV-RNA-Konstrukt, insbesondere in ein HCV-RNA-Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 4 bis 15, oder in ein (isoliertes) HCV-RNA-Vollängengenom einführt, entweder durch gezielte Mutagenese oder durch Austausch von Sequenzabschnitten, die die betreffenden Mutationen enthalten.
- 50 **29.** Hepatitis C Viruspartikel oder virus-ähnliche Partikel dadurch gekennzeichnet,
- daß sie mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 22-24 erhältlich sind.
- 55 **30.** Zellen, infiziert mit Hepatitis C Viruspartikeln oder virus-ähnliche Partikeln gemäß Anspruch 29.

A**B****C****Fig. 1**

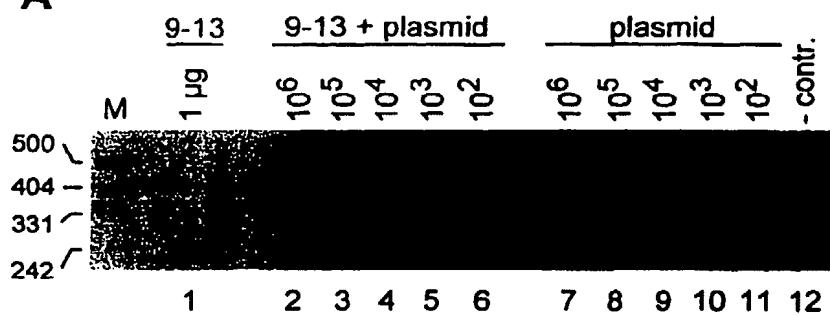
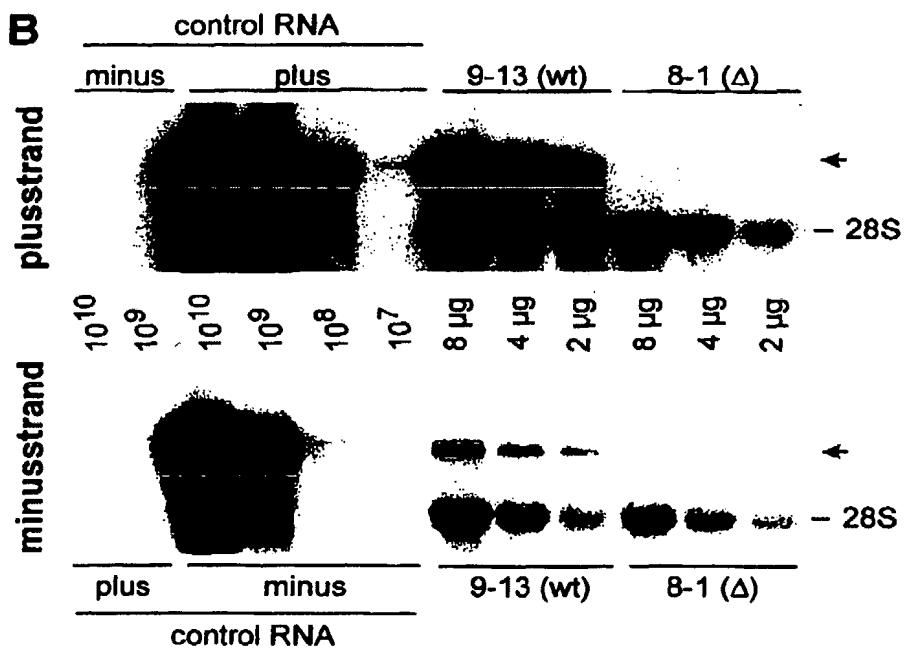
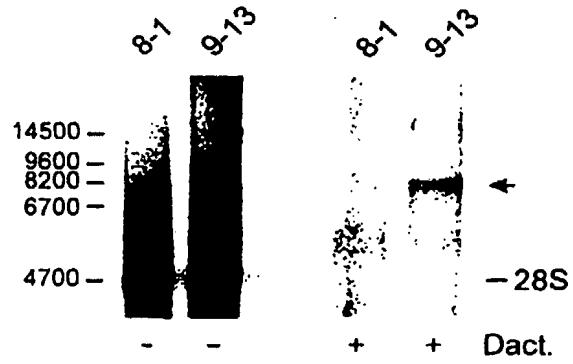
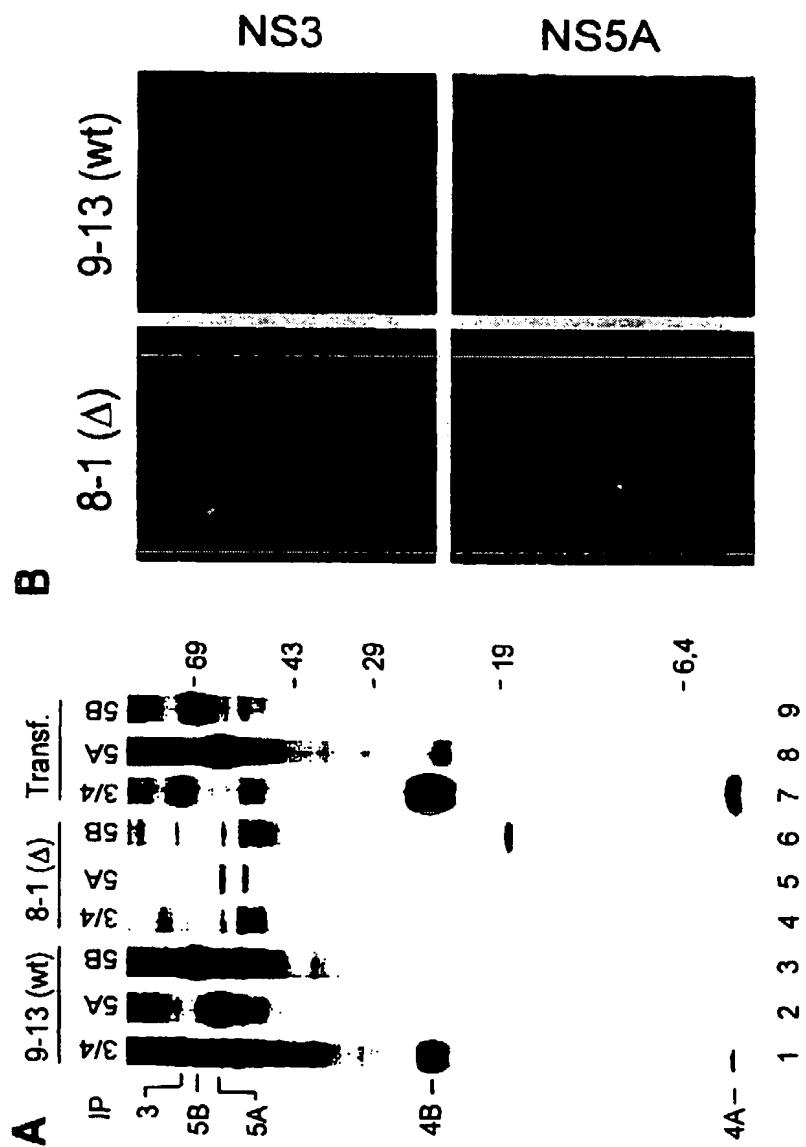
A**B****C****Fig. 2**

Fig. 3



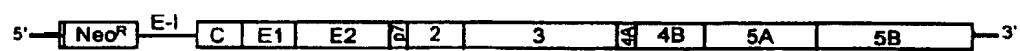


Fig. 4

A



B

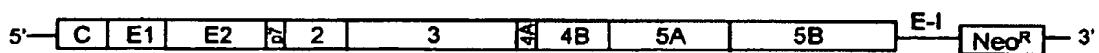
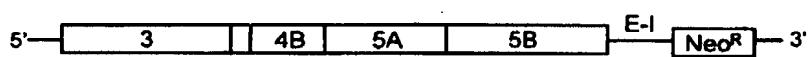


Fig. 5

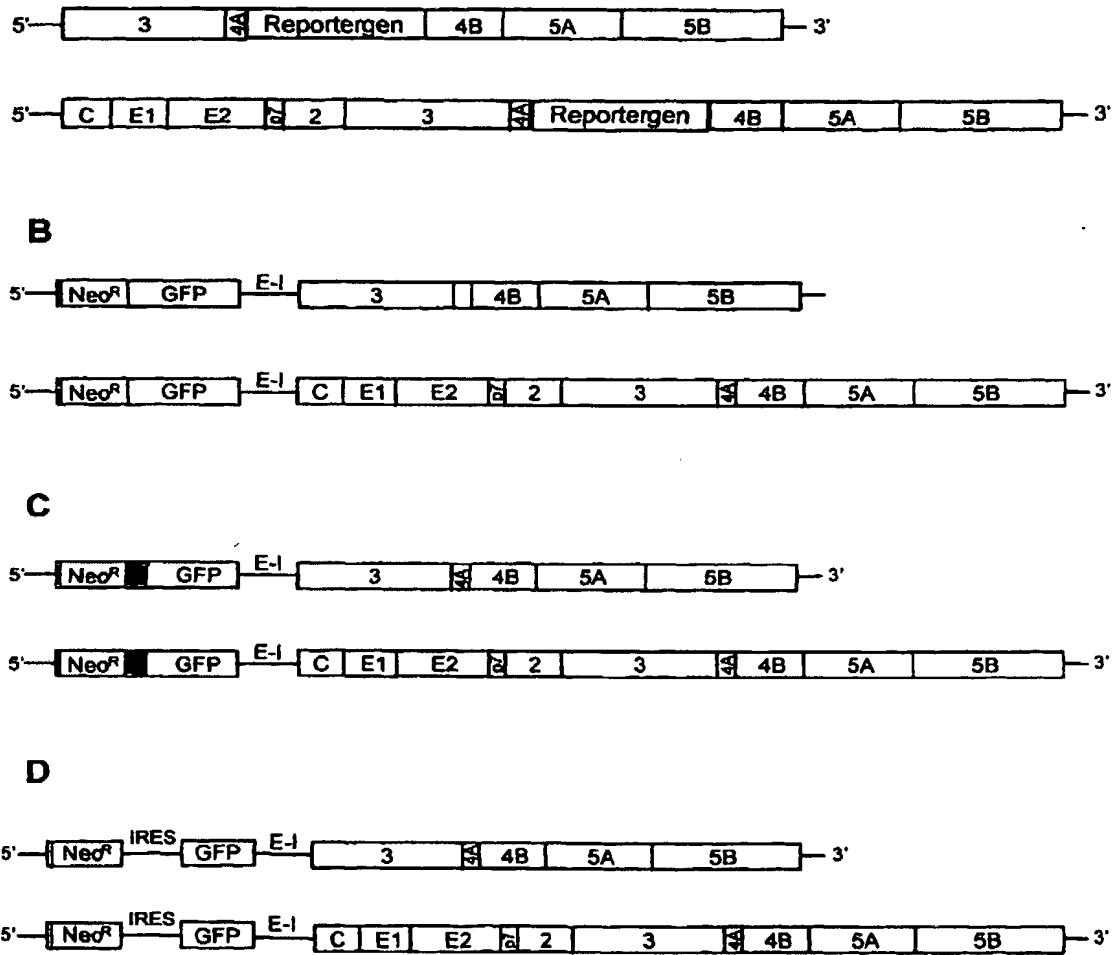


Fig. 6

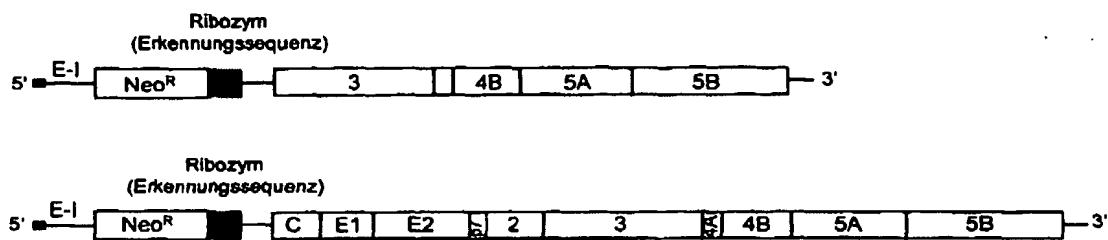


Fig. 7

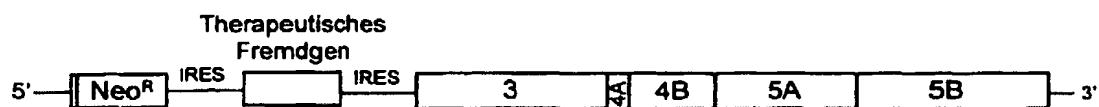


Fig. 8

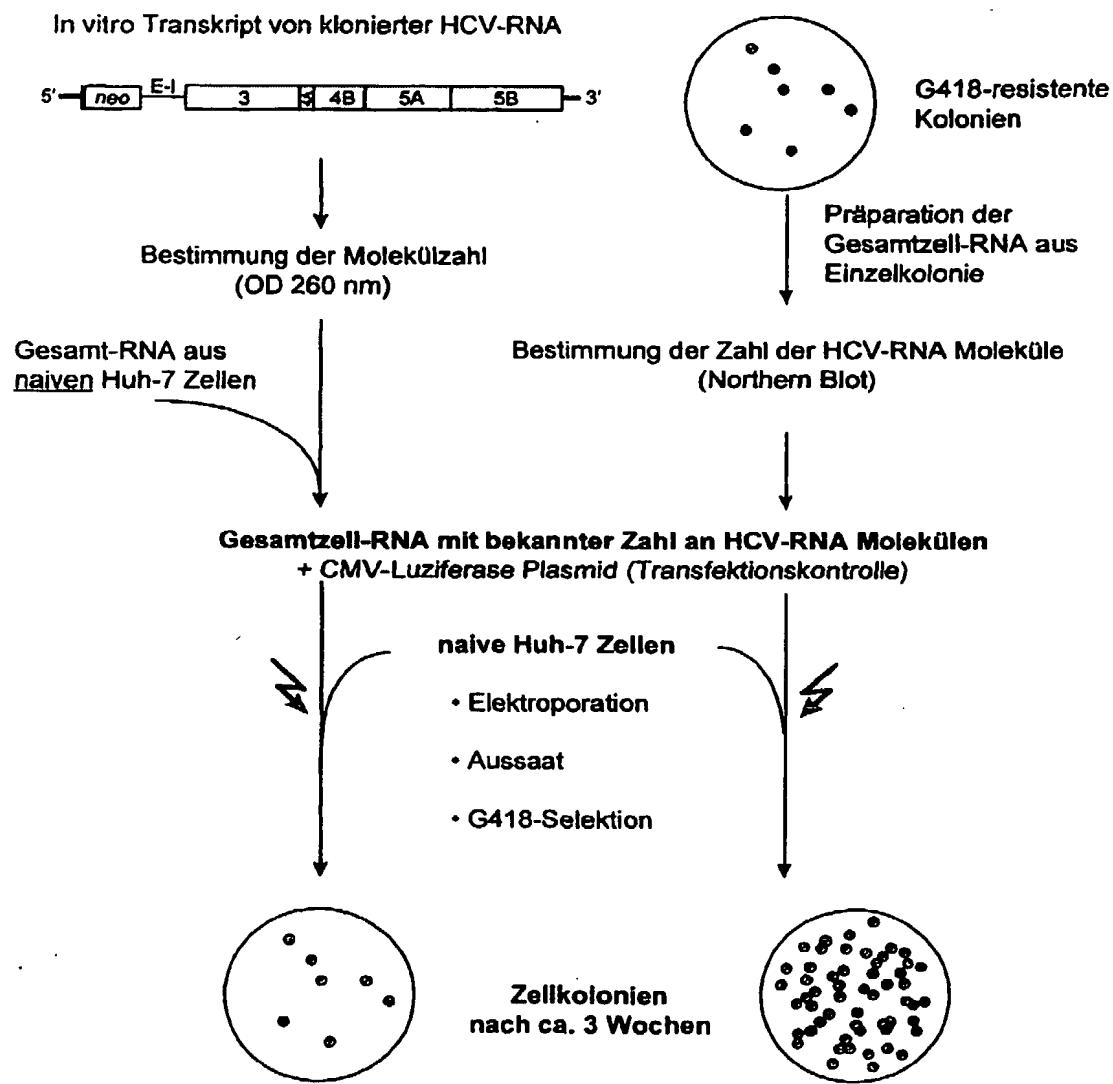
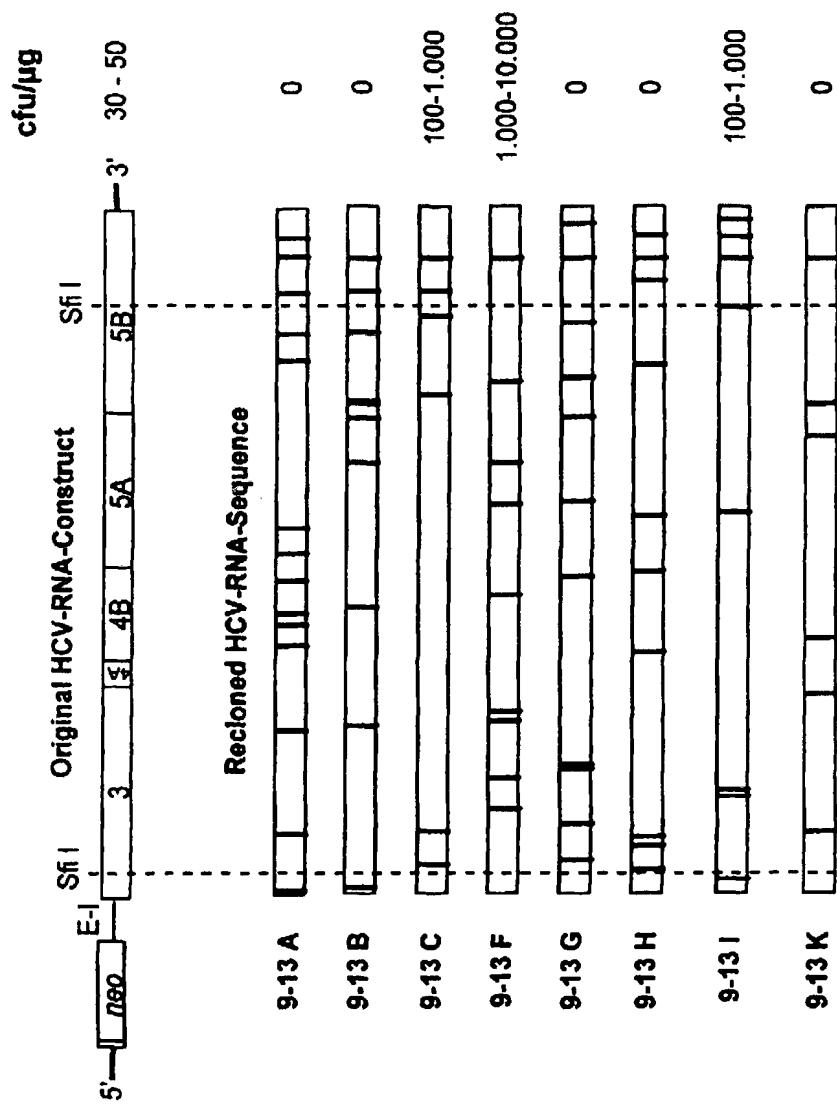
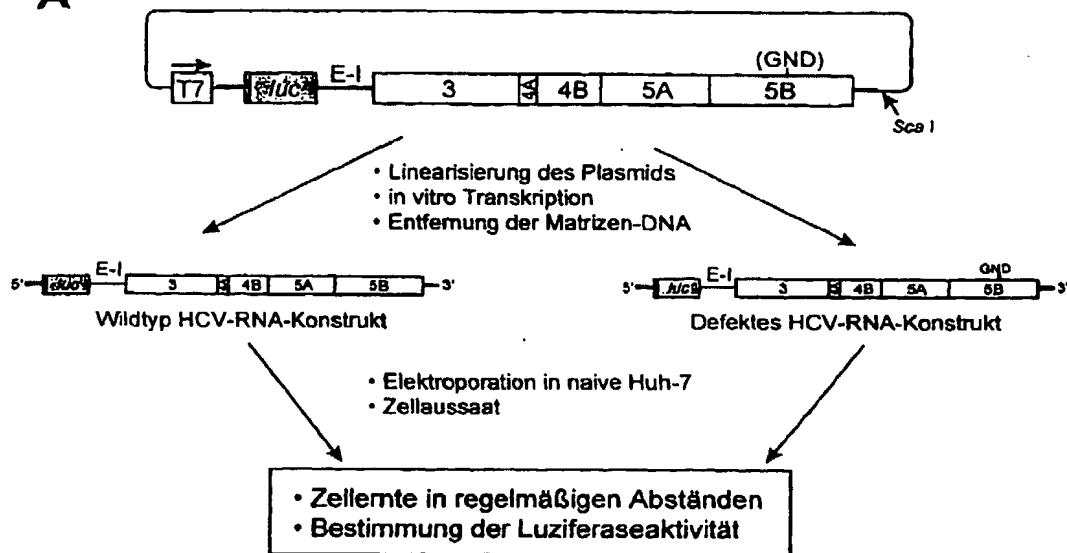


Fig. 9

**Fig. 10**

A



B

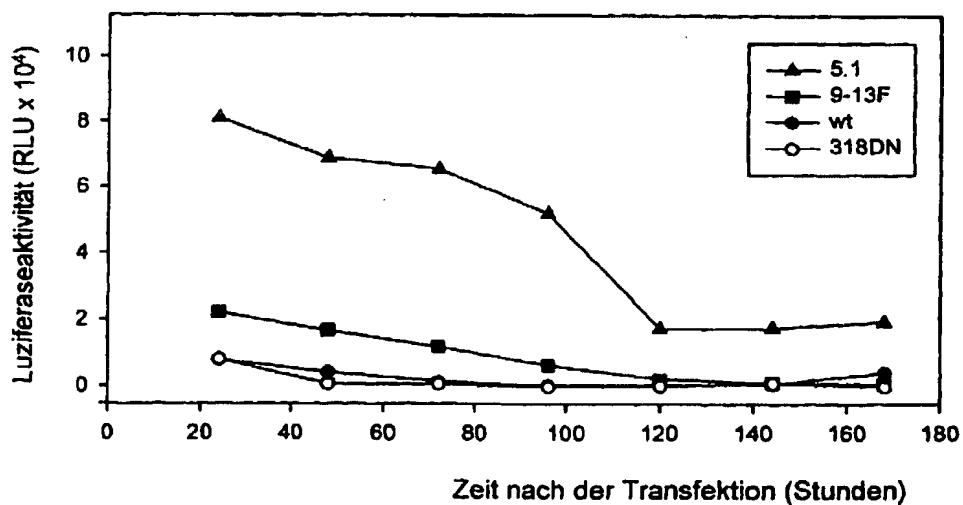
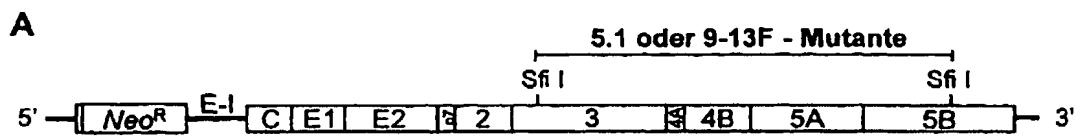


Fig. 11



G418-Konzentration:	500 µg/ml	250 µg/ml	100 µg/ml
Anzahl erhaltener Kolonien:	1	23	75

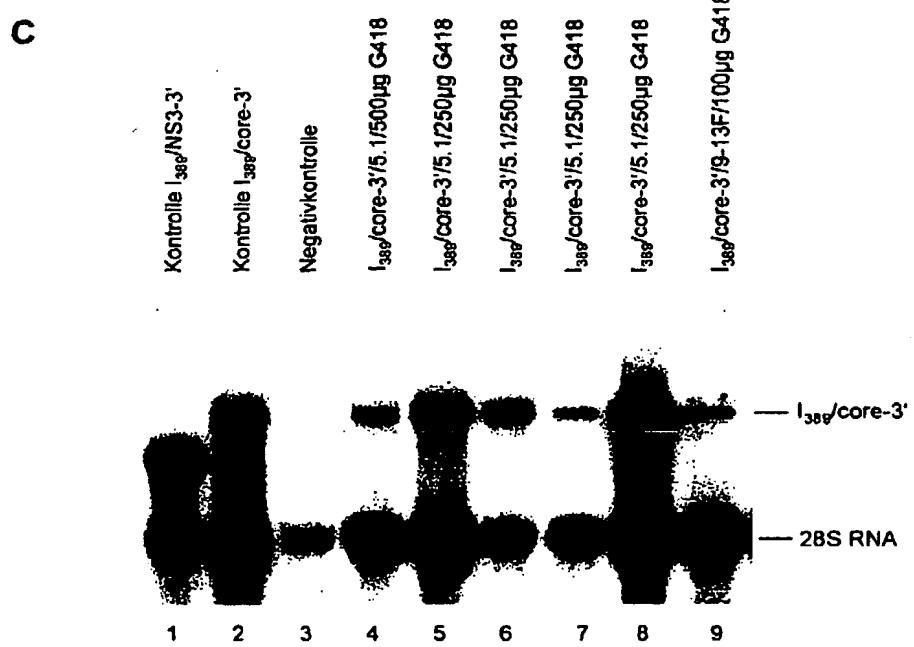


Fig. 12

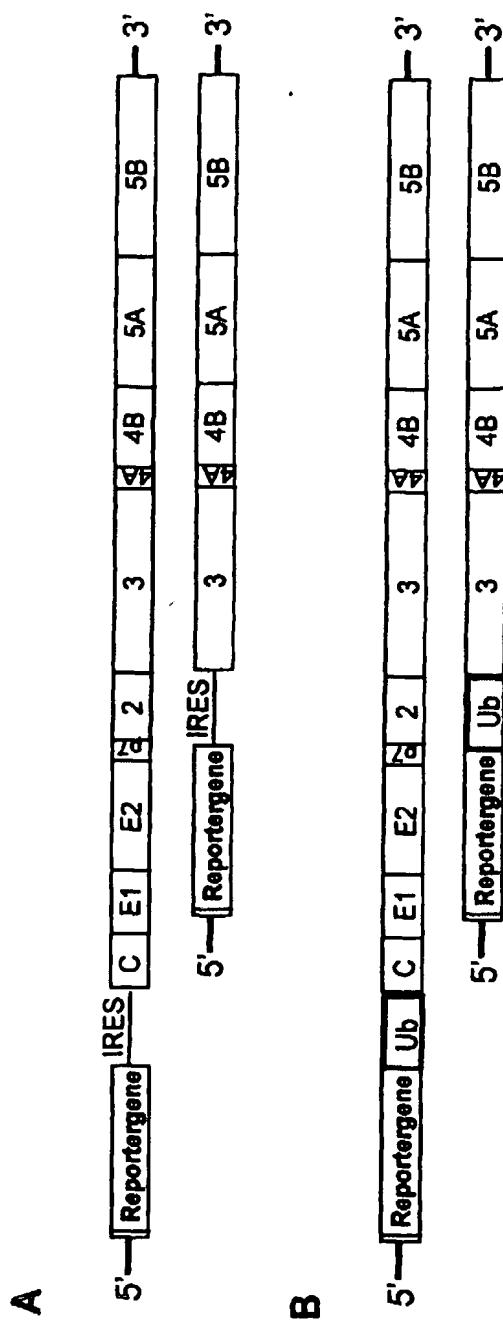


Fig. 13

Fig. 14

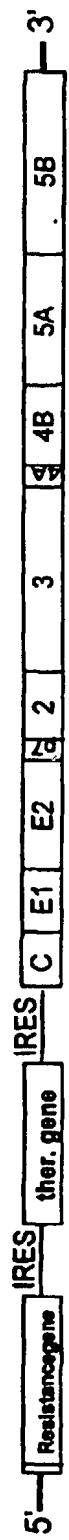


Fig. 15

